

## フロアブルレジンによる大臼歯咬合面 1 級修復の接着信頼性

### —咀嚼想定の動的荷重ストレスによる影響—

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座

○河合貴俊, 柵木寿男, 奈良陽一郎

## Bonding reliability of class 1 occlusal molar restoration using flowable resin composite

### —Influence of dynamic load stress simulating mastication—

Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○KAWAI Takatoshi, MASEKI Toshio, NARA Yoichiro

**【目的】**フロアブルレジン近年、コンポジットレジン国内販売シェアの50%以上を占めるに至っている。また物性の改良改善に伴い、臼歯部咬合面修復を適応とする製品が少数ながらも登場している。本研究では、フロアブルレジンによる大臼歯咬合面1級修復の接着信頼性について、咀嚼想定の動的荷重ストレスによる影響を含め評価検討した。

**【材料および方法】**被験歯には、本学部倫理審査委員会の承認を得たヒト抜去健全上顎大臼歯42本を用いた。修復用レジンには、臼歯部咬合面適応のフロアブルレジン2種、Clearfil Majesty ES Flow (Low) (EF: クラレノリタケデンタル)とMI Low Flow (LF: ジーシー)、および対照としてユニバーサルレジンのFiltek Supreme Ultra Universal Restorative (SU: 3M ESPE)を選択した。接着システムには Scotchbond Universal Adhesive (3M ESPE)を共用した。まず全被験歯に対し透明レジンによる咬合面形態再現用コアの作製を経て、被験歯の3咬頭頂による基準面に基づく規格化植立を行った。ついで、規格化窩洞形成器を用いて Fig. 1 に示す規格化咬合面1級窩洞(C値: 4.2)の形成、窩壁への接着処理、咬合面形態再現用コアを併用による窩底部から2.0 mmを基準とした分割積層充填、湿ボックス中の24時間保管、形態修正・仕上げ研磨を経て、動的荷重ストレス負荷群(S+)と非負荷群(S-)に区分した。S+群には、常温重合レジンによる対合体を介し、修復物表面を含む被験歯咬頭内斜面に対する荷重負荷設定を行い、37°C水中、157 N (16 kgf) × 30 万回 (90 回/分)の動的荷重ストレスを負荷した。その後、全試料は植立軸に平行かつ頬舌側窩縁に直行する4回の縦切断と頬舌側窩縁に平行な2回の縦切断を行い、断面積1.0 mm<sup>2</sup>のビーム状試料3片を得た。全試料はクロスヘッドスピード1.0 mm/分で微小引張接着強さ(μ-TBS)値を測定し、得た値はKruskal-Wallis検定、Mann-Whitney検定の後にメジアンランク法によるWeibull分析によって接着信頼性の評価を行った。なお、ビーム状試料調整中に離断が生じた試料(ptf)については、Kruskal-Wallis検定とMann-Whitney検定では0 MPaとしてデータに含め、Weibull分析では除外した。

**【成績および考察】**EF/LF/SU修復におけるμ-TBS中央値(MPa)はS-: 23.3/27.0/24.6, S+: 22.1/16.0/14.3, ptf数はS-: 1/2/0, S+: 2/6/0であった。分析の結果、ストレス有無にかかわらず、修復用レジンの違いはμ-TBS値に有意な影響を与えないものの、LF・SU修復では、ストレス負荷によってμ-TBS値の減弱が認められた。Fig. 2に、S-/S+条件下における3種修復間のμ-TBSに対する累積破壊確率の違いを示す。EF/LF/SU修復のワイブル係数(Wm)は、S-: 2.1/2.7/3.7, S+: 2.2/3.5/2.5であった。分析の結果、S-条件では、EF・LF修復のWm値がSU修復値と比較して有意に小さいものの、S+条件では、LF修復のWm値がEF・SU修復値より有意に大きかった。またストレス負荷による各修復のWm値の変化は、EFで変化なし、LFで有意に大きくなり、SUで有意に小さくなった。更に臨床的示唆に富むS+条件下の累積破壊確率10%に対する推定応力値は、EF値(8.7MPa)がSU値(7.3MPa)と同等、LF値(12.3MPa)より有意に小さかった。以上の結果から、EF・LF修復は、レジン硬化時の重合収縮によって、S-条件下においても不顕性の接着破壊が生じていることが推察できた。更にストレス負荷によって、Wm値に基づく信頼性は同等または向上を呈するものの、その実態はptfの増加を伴い、確実な接着信頼性の獲得に至っていないことが考えられた。

**【結論】**フロアブルレジンによる大臼歯咬合面1級修復の接着信頼性は、ユニバーサルレジンによる修復と比較して、修復直後では劣る傾向にあり、さらに咀嚼想定動的荷重ストレスの負荷によって不確実となることが推測された。

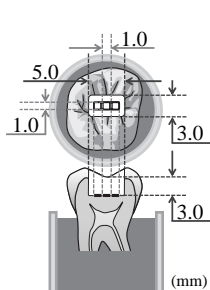


Fig. 1 Standardized class 1 occlusal cavity and three beam specimens for μ-TBS test

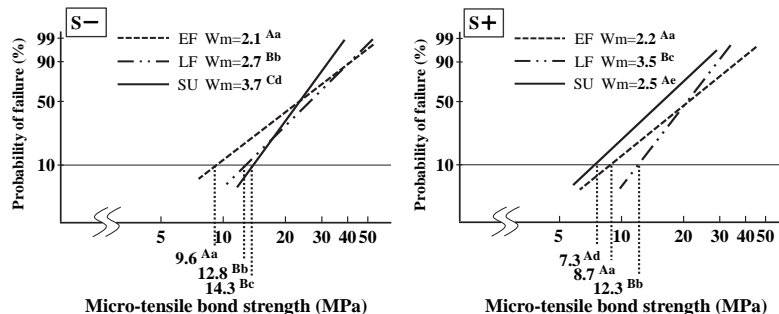


Fig. 2 Difference in the probability of failure against μ-TBS among three restorations  
Different letters mean significant difference at  $p < 0.05$ .  
Uppercase; among three restorations, lowercase letters; between S+ and S-

この研究の一部は JSPS 科研費 26462899 の助成を受けた。

各種コンディショナーを塗布した歯根象牙質に対する  
レジン添加型グラスアイオノマーセメントの接着性能の評価

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科摂食機能保存学講座う蝕制御学分野

<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再建工学分野

○サード アムル<sup>1</sup>、井上 剛<sup>1</sup>、池田 正臣<sup>2</sup>、二階堂 徹<sup>1</sup>、田上 順次<sup>1</sup>

**Effect of dentin conditioning on bond strength of resin-modified glass ionomer cement to root dentin.**

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University(TMDU)

<sup>2</sup>Oral Prosthetic Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University(TMDU)

○SAAD Amr<sup>1</sup>, INOUE Go<sup>1</sup>, IKEDA Masaomi<sup>2</sup>, NIKAIDO Toru<sup>1</sup>, TAGAMI Junji<sup>1</sup>

**Introduction:** A resin-modified glass ionomer cement (RMGIC) has ability to bind physico-chemically to tooth structures without prior treatment. Previous studies reported dentin conditioning improved dentin bond strength. However, there were little information about dentin bonding performance of RMGIC to root dentin. Therefore, the aim of this study was to measure the microtensile bond strengths ( $\mu$ TBS) of RMGIC to sound and artificial caries-affected root dentin using various dentin conditioners.

**Materials and Methods.** Sound and artificial caries-affected dentin (ACAD) were obtained from bovine root. ACAD lesion was created by immersion in demineralizing solution for 60 hours according to the previous methodology (Joves et al, 2013). Lesion depth (about 150  $\mu$ m) was confirmed by a swept-source optical coherence tomography system (Santec OCT-2000, Santec Co., Komaki, Japan). The specimens were ground with #600 SiC paper to obtain standardized smear layer and randomly divided to four groups; no conditioning (Non), Cavity Conditioner (CC) for 10 sec, Self Conditioner (SC) for 10 sec, and 17% EDTA (neutral pH) for 60 sec. A RMGIC (Fuji II LC capsule, GC, Japan) was then mixed and applied on the conditioned dentin. They were stored in artificial saliva for 24 hours before  $\mu$ TBS test. Mode of failure after debonding was checked by scanning electron microscope (SEM).

**Results.:** Mean  $\mu$ TBS values (MPa) and standard deviations in are shown in the Table. Two-way ANOVA revealed that both “type of dentin” and “conditioner” have a significant effect of the  $\mu$ TBS to dentin The  $\mu$ TBSs in Sound were significant higher than those in ACAD for each conditioning group ( $p < 0.05$ ). For sound dentin, there were statistically significant differences in  $\mu$ TBS among the all conditioners except between CC and EDTA ( $p > 0.05$ ). SC provides the highest value, followed by EDTA and CC. The lowest value was obtained in Non. For ACAD, SC and CC provided the highest values, in which there was no statistical difference ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The effect of dentin conditioning on bond strength of RMGI depended on materials and the type of dentin. SC demonstrated superior  $\mu$ TBSs to both sound and caries-affected root dentin.

Table. Mean  $\mu$ TBS values of RMGIC to root dentin (MPa)

	Non	CC	SC	EDTA
Sound	12.9 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	18.3 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	25.3 $\pm$ 3.6	21.5 $\pm$ 3.7 <sup>c</sup>
ACAD	8.0 $\pm$ 2.4	11.9 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	14.6 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 2.9

\*Number of samples for each group=15, groups with same letters are not significantly different.

### 先制医療の実現化へ向けた光学的齲蝕診断法の開発

1:京都府立医科大学大学院医学研究科歯科口腔科学 2:京都工芸繊維大学工学部セラミック物理学  
3:大阪大学医学部整形外科

○足立哲也<sup>1</sup>、山本俊郎<sup>1</sup>、市岡宏顕<sup>1</sup>、Marco Boffelli<sup>1,2</sup>、Wenliang Zhu<sup>3</sup>、金村成智<sup>1</sup>、  
Giuseppe Pezzotti<sup>2</sup>

#### The development of optical dental caries diagnostic method lead to the implementation of preemptive medicine

1:Department of Dental Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine 2: Kyoto Institute of Technology, Ceramic Physics Laboratory 3: Department of Orthopedic Surgery, Osaka University Medical School

○Tetsuya Adachi<sup>1</sup>、Toshiro Yamamoto<sup>1</sup>、Hiroaki Ichioka<sup>1</sup>、Marco Boffelli<sup>1,2</sup>、Wenliang Zhu<sup>3</sup>、Narisato Kanamura<sup>1</sup>、  
Giuseppe Pezzotti<sup>2</sup>

(目的) 歯の喪失は、審美性、発音、咀嚼や嚥下に支障をきたし、全身の健康状態に影響を与える。この原因の約9割が齲蝕と歯周病で占められている。そのため齲蝕を早期に発見し、治療することは、QOL (Quality of Life) の維持に重要となる。近年、疾患を発症前に高い精度で予測し、疾患を発症を防止する先制医療 (Preemptive medicine) と呼ばれる概念が注目されている。歯科分野で先制医療を実現するには、齲蝕を高感度かつ高精度に検出し、予知性を有する診断法の開発が必要である。これまで、齲蝕の画像診断として主にエックス線検査が行われてきたが、この検査では初期の脱灰を透過像として観察することができなかった。また、定量性や客観性の点で不十分で、術者の主観的な判断に頼らざるを得なかった。我々は、非接触かつ非侵襲的に分子構造や結晶性を評価することができるラマン分光法に着目し、齲蝕の新規診断方法になり得るか検討した。

(方法) 京都府立医科大学倫理委員会の承認のもと (ERB-C-136)、インフォームド・コンセントを得た上で、歯周炎や智歯周囲炎により抜歯された廃棄予定の歯を検体とした。検体は修復・補綴処置されていない齲蝕歯を使用し、デンタルエックス線装置 DIGORA Optime UV (Soredex, Finland)、マイクロCT撮影装置 SkyScan1172 (Bruker, MA, USA) で齲蝕の大きさや深度をもとに分類した。ラマン分光測定はトリプルラマン分光装置 T64000 (HORIBA, 京都市) を使用し、歯の構造解析を行った。酸蝕歯モデルでは、健全歯を炭酸飲料 (pH2.5) に30秒から30分間浸漬し、それによって生じるエナメル質の最表層の脱灰の過程を、レーザーマイクロスコプ VK-X (Keyence, 大阪)、ラマン分光法を用い経時的に観察した。

(結果) デンタルエックス線では検出不可能で、高分解能マイクロCTで検出可能な約200 $\mu$ mの齲蝕をラマン分光にて解析した。ラマン分光解析の結果、齲蝕周囲のエナメル質の結晶構造由来のラマンピークは健全エナメル質のラマンピークより低周波側へ移動し、半値幅が増加することが確認できた。また齲蝕周囲のエナメル質のラマン散乱強度は齲蝕の大きさと逆相関し、低下することが確認できた。これらの新たな指標を用いることで、齲蝕の定量化が可能となった。また、酸蝕歯モデルにおいて、炭酸飲料に浸漬したエナメル質表層は、脱灰されていることをレーザー顕微鏡で確認した。その表面をラマン分光解析したところ、ハイドロキシアパタイトに帰属するラマンシフトのピーク位置が高周波数側に移動することが明らかとなった。

(考察) 齲蝕は、歯の構成成分であるハイドロキシアパタイトが齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* の産生する酸により、歯が脱灰されて実質欠損が起こった状態である。今回得られた齲蝕におけるエナメル質のラマン散乱強度の低下やラマンピーク位置の変化、半値幅の増加は、酸によるハイドロキシアパタイトの非化学量論的な組成の変化、結晶学的な構造変化に起因することが考えられる。またラマン分光法は、酸蝕歯モデルにおけるエナメル質の初期の表層脱灰においても、ハイドロキシアパタイト由来のラマンピーク位置の変化を検出することができた。これらの結果より、ラマン分光法は将来齲蝕になるリスクの高い歯をスクリーニングし、齲蝕を発症前に診断することができる可能性があり、先制医療を実現する診断方法になり得ることが示唆された。

## 試作光リフレクトメータを用いた人工初期齲蝕モデルの観察

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>

モリタ東京製作所<sup>3</sup>, 近藤歯科医院<sup>4</sup>

○村山 良介<sup>1</sup>, 高橋 史典<sup>1</sup>, 古市 哲也<sup>1</sup>, 鈴木 崇之<sup>1</sup>, 島村 穰<sup>1</sup>, 崔 慶一<sup>1</sup>,

黒川 弘康<sup>1,2</sup>, 宮崎 真至<sup>1,2</sup>, 三畑 幸則<sup>3</sup>, 近藤 貢<sup>4</sup>

### Observation of Artificial Carious Lesion Using Optical Time Domain Reflectometer

Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science,

Dental Research Center<sup>2</sup> Nihon University School of Dentistry, J. Morita Tokyo Mfg. Corp.<sup>3</sup>, Kondo Dental Clinic<sup>4</sup>

○MURAYAMA Ryosuke<sup>1</sup>, TAKAHASHI Fuminori<sup>1</sup>, FURUICHI Tetsuya<sup>1</sup>, SUZUKI Takayuki<sup>1</sup>, SHIMAMURA Yutaka<sup>1</sup>, SAI Keiichi<sup>1</sup>, KUROKAWA Hiroyasu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, MIHATA Yukinori<sup>3</sup>, KONDO Mitsugu<sup>4</sup>

【緒言】 ミニマルインターベンションの普及に伴って、齲蝕を早期に発見することが望まれている。初期齲蝕はエナメル質の表層下脱灰を特徴とし、その進行の度合によって白斑を呈した際にはじめて目視が可能である。しかし、チェアサイドにおいてこのような基質の変化を定量的に評価し、介入の指標となり得る診断法は未だ確立されていないのが現状である。これまで演者らは、歯質における脱灰抑制および再石灰化傾向を、1310 nm および 840 nm の波長を有する OCT を用いて検討し、第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会において発表した。今回、チェアサイドで、より簡便に計測が可能であり、さらに小型化を計ったペン型プローブを有した光リフレクトメータ OTDR(Optical Time Domain Reflectometer)を用い、人工初期齲蝕モデルのエナメル質脱灰の程度を評価した。

【材料および方法】 試片は、ウシ下顎前歯歯冠部唇側面中央付近の歯質を、モデルトリマーを用いて直径 4~6mm のエナメル質および象牙質で構成されたブロックとして切り出し、調整した。人工初期齲蝕モデルの製作は、エナメル質表面に直径 3mm の円筒状チップを固着し、8%メチルセルロースを注入、24 時間静置した後、その上層に pH4.6 の乳酸からなる溶液を注入、37°C で 30 日間静置し、人工初期齲蝕部位と健全部位が存在する試片を作成した。脱灰の状況は超音波透過法による縦波音速の経時変化を測定することで評価した。

超音波送受信装置としては、パルサーレーザ（Model 5900PR, Panametrics）、縦波用トランスデューサー（V112, Panametrics）およびオシロスコープ（Wave Runner LT584, LeCroy）から構成されるシステムを用いた。さらに試片表面の脱灰状況の観察には走査型レーザ顕微鏡（KEYENCE, VK-9700）を用いた。

計測には波長 1310nm の試作光リフレクトメータ（モリタ東京製作所）を用いた。さらに、波長 1310nm の TD-OCT 装置を同時に使用し、イメージ像の変化を客観的に把握した。すなわち、TD-OCT から信号強度分布グラフを得ることで信号強度を解析し、ピーク値およびその非対称な波形のピーク強度値から 86.5% に低下した値 ( $1/e^2$  値) におけるピーク波形の基底幅 ( $1/e^2$  幅) を求め、経時変化に対する変化量との関連性について検討した。また、波形の積分値を求め、定量的に評価した。

【成績および考察】 試作光リフレクトメータによる人工初期齲蝕部位の信号強度分布 (A-scan) は、健全面に比べ高いものであり、波形の基底幅は増加する傾向が得られた。TD-OCT から得られた信号強度分布を解析した結果、波形の基底幅に一致する  $1/e^2$  幅は健全面よりも有意に増加した。積分値は若干の変化があったものの、有意の差は無かった。人工初期齲蝕部位の超音波縦波音速の変化は、経時的に減少する傾向が得られた。レーザ顕微鏡による人工初期齲蝕部位のエナメル質表面は、健全面に比べ粗造な面を呈しており、エナメル質の表層を一部残し、内部に広がることを示すものであった。これらのことから  $1/e^2$  幅の増加はエナメル質表層の光学的性質の変化に起因するものと考えられる。すなわち、人工初期齲蝕部位は表層下脱灰によってエナメル質の構造が崩れ、内部での光干渉性が向上したため、信号検出が可能になったものと考えられた。

【結論】 本実験で用いた試作光リフレクトメータは、人工初期齲蝕部位と健全面の信号の差を検出することが可能であった。以上のことから、試作光リフレクトメータによる初期齲蝕病巣の評価が可能であることが示唆された。

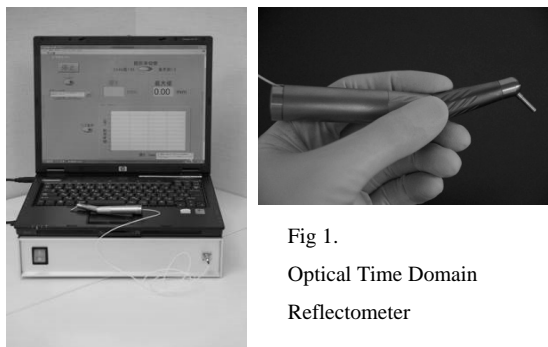


Fig 1.  
Optical Time Domain  
Reflectometer

## 根面う蝕の硬さ-深さ曲線における軟化の特徴

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

○清水明彦

The Common Characteristic of Hardness-Depth Curve in Root Caries  
Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○SHIMIZU Akihiko

### 【緒言】

高齢者や口腔機能の低下した患者などに多発する根面う蝕については、その対応が難しく、多くの歯科医が適切な治療法を模索しているのが現状であろう。咬合面う蝕の場合は、う蝕表層から深部に向ってその硬さを増し、軟化開始部より深部では健全象牙質の硬さを維持している。それ故、臨床でスプーンエキスカバータを使っとう蝕を削除すると、次第に切削抵抗が大きくなりそれ以上の削除は困難なエンドポイントに至る。しかし臨床で根面う蝕を削除する場合、削除を繰り返しても、硬さの変化が分からず、削除のエンドポイント分からないことが多い。

そこで本研究の目的は、根面う蝕の硬さを微小硬度計で測定し、軟化のパターンを明らかにすることである。

### 【材料と方法】

ヒト抜去歯（兵庫医大倫理審査承認番号 586 号）の中から根面う蝕を有する歯を選んだ。歯軸方向に耐水研磨紙を使って歯をすり減らし、最終的に#8000番で仕上げ研磨し、う蝕断面を露出させた。微小硬度計（Akashi MVK-E）を用いて、荷重 25g、負荷時間 15 秒の条件でヌーブ硬さを測定した。

硬さ測定は、う窩底中央部から象牙細管の走行に沿って 50  $\mu\text{m}$  間隔で歯髄壁部までとした。また対照としては、硬さを測定したう蝕部に近く、かつセメント質が存在する健全歯根象牙質について、セメント-象牙境から同様に歯髄壁部までの硬さを測定した。

得られたデータから、硬さ-深さ曲線を作成し、根面う蝕における軟化の様相を健全象牙質の硬さと比較した。

### 【結果】

う蝕の程度により硬さ-深さ曲線のパターンに違いはあるものの、多くの根面う蝕において、う蝕の表層部から歯髄壁部に至る全域において、硬さが低下しているのが認められた（右図）。

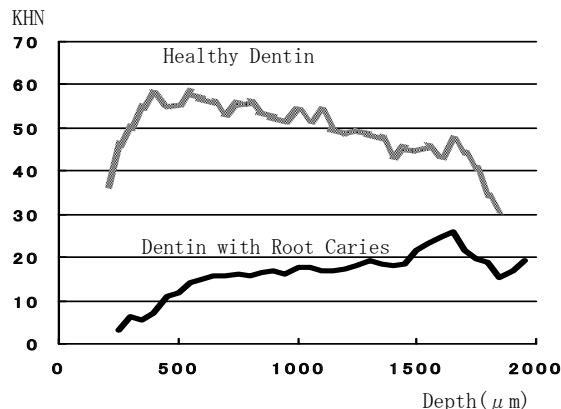
一方、う蝕によっては、その最深部において、健全象牙質と同等、あるいはそれ以上の硬さを示すものもあった。

### 【考察】

う蝕における軟化のパターンを明らかにするために、硬さ-深さ曲線を作成したところ、ほとんどの根面う蝕では表層部から歯髄壁部に至る全域において硬さが低下していたが、その理由として、以下のようなことが考えられる。根面象牙質を覆うセメント質は、その厚みにおいても硬さにおいても咬合面エナメル質の 20 分の 1 ほどであり、う蝕の侵襲により容易に崩壊し消失すると考えられる。短時間のうちにセメント質を失った歯根象牙質は、咬合面象牙質のように生活反応を利用してう蝕の侵襲を食い止める時間的余裕がなく、その結果、象牙質の全域がう蝕の影響を受け、う蝕の直下から歯髄壁部に至る全域に渡って硬さが低下したものと推察される。

### 【まとめ】

抜去歯の根面う蝕について、硬さ-深さ曲線を作成し軟化のパターンを調べたところ、多くの根面う蝕においては、う蝕表層部から歯髄壁部に至る象牙質の全域において硬さが低下していることが示された。



マイクロ CT を用いたコンポジットレジンおよび  
ガラスアイオノマーセメント修復物周囲の根面脱灰抑制効果の解析  
東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 歯蝕制御学分野  
○カイン ウィンザン、住谷雄大、中村圭喜、半場秀典、二階堂徹、田上順次

**Micro-computed tomography assessment on in vitro root demineralization around resin composite and glass ionomer restorations**

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

○KHINE Win Zan, SUMITANI Yuta, NAKAMURA Keiki, HAMBА Hidenori, NIKAIIDO Toru, TAGAMI Junji

**Background and Purpose:** In the aged population, there is an increase in number of exposed root surfaces, leading to an increase in prevalence of root caries. Restoration of root dentin carious is challenging and several restorative materials, such as resin composite, glass ionomer cement, and resin-modified glass ionomer cement, have been used. Micro-CT assessment enabled 3D nondestructive analysis in mineral density (MD) and mineral loss (ML) of enamel demineralization (Hamba H. et al., J Dent, 2011). Therefore, the purpose of this study was to assess inhibitory effect of three different types of restorative materials against acid attack around the restorations by using micro-CT.

**Materials and Methods:** The dentin specimens were prepared from buccal surfaces of bovine roots. In each specimen, a cavity (2 mm diameter and 2 mm depth) using a diamond bur (#202, Shofu, Japan) surrounding by 1 mm tooth structure was prepared. All surfaces of each specimen were ground with #600 SiC paper under running water. One of three restorative materials; Clearfil SE Bond/Clearfil Majesty ES High Flow (Kuraray Noritake Dental, Japan) (SE-ES), FL-BOND II/Beautiful Flow F10 (Shofu, Japan) (FL-BF), and Fuji VII capsule (GC, Japan) (Fuji VII), was placed in the cavity according to the manufacturers' instructions. They were then immersed in artificial saliva (pH 7.0) for 24 hrs at incubator (37 °C). The surfaces of the restorations were ground with #600 SiC paper under running water. All surfaces of each specimen were covered with nail varnish, leaving a window (3 mm x 3 mm) exposed on the polished surface. They were immersed in demineralizing solution (pH 4.5) for 24 hr, followed by 72 hr. All the specimens were scanned with micro-CT (Inspexio SMX-100 CT, Shimadzu) (1024 x 1024, 5 μm/pixel) at three times; before demineralization, and after 24 hr and 96 hr demineralization, respectively. Following this, the MD and ML values of dentin around the restorations were calculated from the mineral profile of each specimen (TRI/3D BON, -DIF, -TMD, Ratoc, Tokyo, Japan). The data were statistically analyzed by one-way ANOVA with Tukey's test. In order to confirm and compare the micro-CT results, the same specimens are being observed with scanning electron microscopy.

**Results:** Fuji VII showed the lowest lesion depth among three groups after 24 and 96 hr demineralization, followed by FL-BF and SE-ES. Fuji VII showed the highest MD after 24 hr and 96 hr demineralization. SE-ES and FL-BF showed similarity in MD after 24 hr demineralization, while FL-BF showed higher MD value than SE-ES after 96 hr demineralization. The ML value provided with Fuji VII was significantly lower than those with SE-ES and FL-BF after 24 hr and 96 hr demineralization. However, there were no significant differences between SE-ES and FL-BF after both 24 hr and 96 hr demineralization.

**Conclusion:** Fuji VII has more inhibitory effect on root dentin demineralization compared to SE-ES and FL-BF. Micro-CT demonstrated quantitative assessment of detecting mineral loss, mineral density and lesion depth of root dentin around the filling materials.

## コンポジットレジンの弾性率が レジン支台築造歯の内部応力分布に及ぼす影響

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野

<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 部分床義歯補綴学分野

○千葉彩香<sup>1</sup> 畑山貴志<sup>1</sup> 貝ノ瀬公典<sup>1</sup> 中島正俊<sup>1</sup> 若林則幸<sup>2</sup> 田上順次<sup>1</sup>

### The influence of elastic moduli of resin composites on stress distributions in resin build-up teeth with or without fiber posts.

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>Removable Partial Prosthodontics, Tokyo Medical and Dental University

○Ayaka Chiba<sup>1</sup>, Takashi Hatayama<sup>1</sup>, Kimisuke Kainose<sup>1</sup>, Masatoshi Nakajima<sup>1</sup>, Noriyuki Wakabayashi<sup>2</sup>, Junji Tagami<sup>1</sup>

#### 【目的】

近年、根管処置歯の修復において広く用いられているファイバーポスト・コンポジットレジン支台築造法は、重篤な歯根破折などのトラブルを回避することができるかと報告されている。これは、これまで用いられてきた金属製既成ポストや鋳造ポストと比べ、象牙質に近い弾性率をもつファイバーポストおよびコンポジットレジンを用いることで、ポスト先端部における応力集中を軽減できることによるものとされている。一方で、実際に用いられているコンポジットレジンの弾性率は象牙質より低く、また様々であることが報告されている。しかしながら、コンポジットレジンの弾性率がレジン支台築造歯の内部応力分布にどのような影響を与えるかについての報告は少ない。本研究の目的は、レジンポスト&コアおよび歯根の内部、さらに両者の接着界面に生じる最大応力を基に、コンポジットレジンの弾性率が内部応力分布に及ぼす影響をファイバーポスト埋入の有無の影響とともに、有限要素法を用いて検証を行うことである。

#### 【方法】

根管治療後の第一小臼歯歯根、歯根膜、歯槽骨、根管充填材、レジンコアおよびセラミッククラウンからなる三次元ボリュームを製作した。各部は接着していると仮定し、弾性係数とポアソン比は報告されている実験値を引用し、象牙質の弾性率はこれまでの報告から 18000 MPa、コンポジットレジンの弾性率に関しては 12000/18000/24000 MPa の 3 種類に設定した。6 mm のポスト窩洞にファイバーポストを埋入したものと埋入していないコンポジットレジン支台築造モデルを作成し、各モデルを六面体要素により分割し、節点数 178,860、要素数 126,336 で有限要素法解析を行った。骨の底面を固定し、歯軸方向から頰側に 45° 傾斜した 400N の荷重をクラウン頰側咬頭頂に負荷し、ポストコアおよび歯根内部のミーゼス応力並びにレジンコアと歯根の接合界面におけるせん断応力を算出した。

#### 【結果および考察】

本実験の条件下では、今回用いたコンポジットレジンの弾性率のどのモデルにおいても、重篤な歯根破折を誘発するポスト先端部における応力集中は認められなかった。一方で、舌側(非荷重側)歯槽骨頂部に見られた歯根部の応力集中は、ファイバーポスト埋入の有無による影響は少なく、コンポジットレジンの弾性率が高くなるにつれ減少した。

また、レジンコア上面中央部に生じた内部応力をファイバーポスト埋入により著しく軽減させることができたが、レジンコアの舌側(非荷重側)歯頸部辺縁ではファイバーポスト埋入により内部応力を増加させ、コンポジットレジンの弾性率が低いほどその影響は大きかった。

舌側(非荷重側)および頰側(荷重側)歯頸部のレジン-歯根接合界面に生じたせん断応力において、ファイバーポストの埋入による軽減効果はなく、コンポジットレジンの弾性率を高くすることにより小さくなった。

本研究の解析モデルでは、歯質とコンポジットレジンが完全に接着していることを想定し各部の応力を算出している。接着界面が部分的に破断することによりレジン支台築造歯の内部応力分布は変化し、コンポジットレジンの弾性率やファイバーポストの有無の影響は変わってくるものと思われるが、完全接着モデルにおいてレジン支台築造歯の接着の破断リスクを軽減させるためには、象牙質に近似した、もしくはやや高い弾性率のコンポジットレジンを選択することが有用であると考えられる。

#### 【結論】

歯根内部および接合界面に生じる応力は、ファイバーポスト埋入によって軽減されず、コンポジットレジンの弾性率を高くすることにより小さくなった。レジンコア内部の応力分布では、コンポジットレジンの弾性率が高くなることにより応力が大きくなったが、ファイバーポスト埋入による応力の増減は部位によって異なった。

## くさび状欠損を想定したクラックと脱灰の進行モデルに関する検討

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野  
○中村圭喜, 半場秀典, 住谷雄大, カインウィンザン, 二階堂徹, 田上順次

**Relationship between micro-crack and demineralization using micro-CT**  
Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University  
○Keiki Nakamura, Hidenori Hamba, Yuta Sumitani, Khine Win Zan, Toru Nikaido, Junji Tagami

### 【緒言】

近年、ブラキシズムによる咬耗や加齢変化によってエナメル質の菲薄化が問題となっている。エナメル質が菲薄化した歯牙に過度な咬合力が加わることにより、エナメル質から象牙質へ達するクラックが生じる可能性がある。特に、歯頸部に生じるくさび状欠損の多くは、エナメル質の咬耗やブラキシズムが原因であることが示唆されているが、クラックと欠損との関係については不明な点が多い。試料を破壊することなく三次元的に観察可能なマイクロ CT は、内部構造の観察に有用であり、演者らは、歯牙に生じたクラックの観察およびミネラルの定量評価が可能であることを報告した(第140回日本歯科保存学会)。本研究の目的はマイクロ CT を用いて、微小クラックと脱灰進行の関係を検討することである。

### 【材料と方法】

抜歯後に水中保管されたヒト健全小臼歯 6 本を使用した。抜去歯の使用に際しては、東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認(第725号)を得た。軟組織を除去し、歯面をブラシで清掃後、常温重合レジンを用いて試料台に固定し、マイクロ CT (SMX-100CT, 島津製作所)を用いて、管電圧 100 kV、管電流 30  $\mu$ A、解像度 1024 $\times$ 1024 pixel、スライス厚 10  $\mu$ m、ビームハードニング補正の条件下で連続的な断層撮影を行った。断層撮影された画像は、画像処理ソフト (TRI/3DBON, ラトックシステムエンジニアリング)により三次元構築を行い、観察・分析に供した。CEJ から 1mm 以外の根面にネイルバーニッシュを塗布し、人工脱灰液に 7, 14 日間浸漬した。脱灰後に断層撮影を行い、クラックの程度および脱灰変化を解析した。また、観察後の試料を包埋、半切し、研磨後に SEM 観察を行った。実験期間中は試料の乾燥を防ぐために、密閉パック(湿度 100%)にて保管した。マイクロ CT と SEM 観察で得られたエナメル質および象牙質に生じた亀裂の幅および浸透を求め、統計学的処理を行った。

### 【結果および考察】

マイクロ CT 観察において、クラックが観察されない群では根面に平面的な脱灰が観察され、CEJ に沿って脱灰が進行する像が観察された。一方クラックが認められた群では、有意に高い脱灰によるミネラル喪失を示した。脱灰の進行により、CEJ のエナメル質が菲薄になって残存する形態が観察された。SEM 観察では、マイクロ CT と同様にクラックが観察され、クラックに沿って脱灰が進行している像が観察された。クラック周囲の脱灰程度が大きかったことから、脱灰がクラックに沿って進行した場合に、くさび状欠損をより速く進行させる可能性を示唆した。日常的に観察されるクラックにおいて、歯頸部に生じたクラックは咬合による可能性が高く、今後の検討課題である。

### 【結論】

歯冠部にクラックを有する歯牙はクラックを認めない歯牙よりも脱灰が進行することが示唆された。マイクロ CT 解析は、三次元的にクラックおよび脱灰を観察することができ、くさび状欠損を想定したモデルの経時的観察に有用であることが示された。



## 新規近赤外光口腔内カメラによるフィッシャーシーラント面の観察

日本大学歯学部小児歯科学講座  
○高森一乗

Observation with new near infrared dental camera of disk surface after applied pit and fissure sealants

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry  
○TAKAMORI Kazunori

### 【緒言】

新しく認可された波長 780nm のレーザーを応用した透過光齲蝕検査装置である DIAGNOcam (以下 cam とする) は、永久歯のみでなく乳歯齲蝕にも有効性が高いことを演者は報告した<sup>1)</sup>。本装置の特徴としてエックス線被曝なく齲蝕の画像検査が可能であることより、今後小児歯科臨床で幅広く応用されていくものと考えられる。

フィッシャーシーラント (以下 FS とする) は、乳歯や幼若永久歯の小窩裂溝部の齲蝕予防効果が高いことより臨床で頻用されている。我々は臨床において FS 充填面を cam にて観察し、歯質よりやや陰影を呈することを報告した<sup>2)</sup>。cam は FS 下、周囲の齲蝕検査にも応用が可能と考えられるが、cam を用いて FS 処置後の歯面を詳細に検討した研究はない。今回、各社の FS が cam の取得画像にどのような影響を与えるかについて基礎的な検討を行ったところ興味ある知見が得られたので報告する。

### 【試料ならびに方法】

工業用アパタイトディスクを用い、ディスク表面に深さ 1.0mm となるように裂溝を想定した溝を形成し、FS をメーカー指示に従って充填した。FS として Teeth mate F1<sup>R</sup> 2.0 (以下 TFn (無色), TFr (赤色), TFw (白色 (不透明)) とする; Kuraray Noritake Dental), Clinpro<sup>TM</sup> Sealant (以下 CS とする; 3M), Beauty Sealant (以下 BS とする; SHOFU), Fuji III LC (以下 III LC とする; GC) を用いて、光照射器 (Pencure, モリタ) にて 30 秒間照射を行った。なお歯面処理に関しては各メーカーの指示に従って行った。充填後に cam にて画像採取し、得られた画像データを画像解析ソフト Image J (NIH) を用いて各 FS のコントラストを 256 階調にて 3 か所測定し、最も高い値を代表値とした。

### 【結果】

各 FS の充填前・後のコントラスト値の変化は、CS が最も大きく次いで BS, TFw であった。TFn, TFr は充填前後でほとんど変化が認められず、III LC は両者の中間程度の変化を示した。TMn, TMr と III LC 間には有意差が見られなかったが BS ならびに CS 間とは有意差を認め、製品やその色調により cam 画像の特性が異なることが明らかとなった。

### 【まとめならびに考察】

基礎研究において充填面の cam 画像のコントラストは歯冠色を呈する FS 製品において大きく変化することが明らかとなった。その理由として含有物ならびにその量の違いによるものと考えられた。

cam の齲蝕検査は、健全歯質と齲蝕罹患歯質とのコントラストの変化をその要点としており、FS 下、周囲の齲蝕検査においては、FS の製品によりその画像特性が異なることを考慮に入れる必要がある。一方で FS とディスク表面との境界は明瞭であることより、FS の充填状況の確認に本装置の有用性が示唆された。

### 【文献】

- 1) 高森一乗他: 乳歯齲蝕検査に DIAGNOcam を使用した症例; 日レ歯誌 25, 148-152, 2014.
- 2) 高森一乗他: 乳歯ならびに幼若永久歯の齲蝕診査に歯科診断用口腔内カメラを用いた症例; 障歯誌 35, 405, 2014 (抄).

成人を対象とした **Tooth Wear** に関する調査 (第三報) 多変量解析による酸蝕症関連因子の年齢階級別検討  
東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野<sup>1</sup> 東京医科歯科大学研究・産学連携推進機構<sup>2</sup>

○北迫勇一<sup>1</sup>、佐々木好幸<sup>2</sup>、高垣智博<sup>1</sup>、田上順次<sup>1</sup>

Epidemiological study on Tooth Wear for adult population

Part 3: Factors associated with the incidence of erosive wear: A logistic regression analysis

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, <sup>2</sup>Research and Industry-University Alliance Organization, Tokyo Medical and Dental University  
○Yuichi Kitasako<sup>1</sup>, Yoshiyuki Sasaki<sup>2</sup>, Tomohiro Takagaki<sup>1</sup>, Junji Tagami<sup>1</sup>

**【研究目的】**

演者らは、第 139 回および第 140 回保存学会において、成人を対象とした **Tooth Wear** に関する調査報告した。今回、多変量解析を用いて酸蝕症関連因子の年齢階級別検討を試みたので報告する。

**【材料と方法】**

本研究趣旨に同意が得られた被験者 1108 名 (平均年齢 49.1 歳) に対し、**Tooth Wear** に関する口腔内診査を全顎的に行った後、生活習慣に関するアンケート調査を実施した。すなわち、アンケート調査では、各種酸性飲食物の摂取状況 (種類と頻度) のほか、夜中に水を摂取する頻度、寝酒の有無、胸やけの有無ならびに持続的な嘔吐の有無 (有の場合はその頻度) について調査した。**Tooth Wear** スコア結果は、10 歳年齢階級、酸蝕有無 (酸蝕症群・非酸蝕症群)、各種アンケート結果は、10 歳年齢階級および酸蝕有無別に各々%表示で集計した。その後、両結果を、ロジスティクス解析 (変数増減法: **Step-wise** 法で変数選択) を用いて統計学的に解析し、酸蝕症と関連する日常生活習慣について検討を行った。

**【結果および考察】**

酸蝕症は、全世代を通じ 26.2%で認められた。各世代における酸蝕症関連因子のオッズ比・95%信頼区間値・p 値を表 1 に示す。10-30 代では炭酸飲料など酸性飲料が、40 代~70-80 代では、これに加えて酸性果実が主たる要因として関連していた。また、スポーツ飲料が全世代において要因となりうる事が示唆され、その背景としてスポーツ時の摂取のみならず、熱中症対策と全世代で摂取される影響が考えられた。

**【結論】**

多変量解析を用い年齢階級別の酸蝕症関連因子について検討した結果、世代間で異なる要因 (酸性飲食物など) と全世代に共通する要因 (スポーツ飲料など) が示唆された。

Table 1. Stepwise multiple logistic regression analyses for association of erosive tooth wear in different age groups.

	Odds ratio	95%CLs		p-Value		Odds ratio	95%CLs		p-Value
		Lower	Upper				Lower	Upper	
<b>15-29 yrs (EP: n = 59, EN: n = 132)</b>					<b>(40-49 yrs cont.)</b>				
● Carbonated soft drinks					● Energy drinks				
AE vs. ST & NE	3.50	2.13	6.13	< .0001	AE vs. ST & NE	4.71	1.46	16.10	0.0086
● Sport drinks					● Orange & Grapefruit juice				
AE & ST vs. NE	2.11	1.48	3.05	< .0001	AE vs. ST & NE	4.09	1.57	12.59	0.0059
<b>30-39 yrs (EP: n = 48, EN: n = 132)</b>					● Repeated vomiting				
● Carbonated soft drinks					WE vs. MO & NE	5.81	1.67	30.08	0.0107
AE vs. ST & NE	4.35	2.48	8.15	< .0001	<b>50-59 yrs (EP: n = 41, EN: n = 141)</b>				
● Energy drinks					● Grapefruit				
AE & ST vs. NE	1.85	1.08	3.21	0.0254	AE vs. ST & NE	3.89	1.99	8.64	0.0002
● Vinegar drinks					● Sport drinks				
AE vs. ST & NE	5.69	2.04	20.55	0.0021	AE vs. ST & NE	2.50	1.16	5.81	0.0211
● Orange & Grapefruit juice					● Vinegar drinks				
AE vs. ST & NE	4.63	2.52	9.15	< .0001	AE & ST vs. NE	1.90	1.25	5.81	0.0027
● Consumption of acidic drinks per day					<b>60-69 yrs (EP: n = 48, EN: n = 138)</b>				
3T & 1-2T vs. NE	3.67	1.47	13.69	0.0180	● Grapefruit				
● Drink water around midnight					AE vs. ST & NE	3.34	1.96	5.99	< .0001
AE & ST vs. NE	1.64	1.04	2.66	0.0254	● Carbonated soft drinks				
● Repeated vomiting					AE & ST vs. NE	2.30	1.49	3.60	0.0002
WE vs. MO & NE	3.73	1.26	11.87	0.0157	● Sport drinks				
<b>40-49 yrs (EP: n = 45, EN: n = 146)</b>					AE & ST vs. NE	1.72	1.16	2.56	0.0071
● Orange					<b>70-89 yrs (EP: n = 49, EN: n = 129)</b>				
AE & ST vs. NE	2.60	1.53	4.84	0.0010	● Apple				
● Foods in sweetened vinegar					AE vs. ST & NE	1.82	1.27	2.61	0.0010
AE & ST vs. NE	3.94	1.97	8.45	0.0002	● Have a drink at bedtime				
● Carbonated soft drinks					AE vs. ST & NE	3.81	1.41	17.14	0.0199
AE vs. ST & NE	3.06	1.47	6.55	0.0027					
● Sport drinks									
AE vs. ST & NE	12.65	4.61	59.37	<.0001					

EP: Erosive wear positive group, EN: Erosive wear negative group, AE: Almost every day (5 or more days per week), ST: Sometime (1 to 4 days per week), NE: Never, 3T: 3 times or more, 1-2T: 1-2 times, WE: over 1 time per 1 week, MO: over 2 time per 1 month.

## 口腔内カメラの映像を見ながら行う窩洞形成 第2報：直視で行う上顎大白歯一級の窩洞形成との比較

<sup>1</sup> 鶴見大学歯学部保存修復学講座, <sup>2</sup> 藤江デンタルクリニック

○藤江英宏<sup>1,2</sup>, 林応璣<sup>1</sup>, 齋藤渉<sup>1</sup>, 英將生<sup>1</sup>, 藤江進<sup>2</sup>, 桃井保子<sup>1</sup>

Cavity Preparation with Live Video Captured by an Intraoral Camera

Report 2: A Comparison with Class 1 Cavity Preparation in Upper Molar under Direct Vision

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine<sup>1</sup>

Fujie Dental Clinic<sup>2</sup>

○FUJIE Hidehiro<sup>1,2</sup>, HAYASHI Oki<sup>1</sup>, SAITO Wataru<sup>1</sup>, HANABUSA Masao<sup>1</sup>, FUJIE Susumu<sup>2</sup>, MOMOI Yasuko<sup>1</sup>

【緒言】私たちは第141回学会にて口腔内カメラの映像をテレビモニターで見ながら行う窩洞形成がミラーで見ながら行う方法よりも正確であることを報告した。しかしミラーで見ながら行う窩洞形成は概して直視での窩洞形成のレベルに達しない学生が多い。今回の研究の目的は窩洞形成の実習を終了した学生に追加で短時間の口腔内カメラのトレーニングをさせた場合、直視での窩洞形成と比較して口腔内カメラの映像を見ながら行う窩洞形成がどの程度正確にできるかを調べた。なおこの研究に利益相反関係にある企業はない。

【材料および方法】保存修復学の講義および実習を終了し、実技試験にも合格した学生24人(男性12人, 女性12人)を対象者とした。この研究は本学歯学部倫理審査委員会の承認を受けた(受付番号1104)。彼らは正規の実習の中で直視での窩洞形成の実習を30時間受けている。対象者は実験の直前に2時間30分のトレーニングを受けた。トレーニングは口腔内カメラの使い方と映像を見ながら左上第一大臼歯の窩洞形成する内容であった。今回の実験では口腔内カメラ(サテライトスコープDP6ver.2, アールエフ)の映像を液晶テレビ(アクオスLC-13S1-S, シャープ)に映して行ったが、映像は180度回転し左右反転したものを用いた。実験ではマネキンの左上第一大臼歯の人工歯の窩洞形成を1本目は直視で、2本目は口腔内カメラの映像を見ながら行わせた。人工歯は咬合面が平坦になっていて、その中央には円柱状(直径7mm, 深さ4mm)にピンク色のセメント(キャビトンEX, ジーシー)が充填されている。そのセメントの周りには黄色い石膏(ニュープラストーン, ジーシー)が充填されている。対象者はインレー形成用ダイヤモンドポイント(301, 松風)で人工歯の中央にあるセメントをできるだけ完全に削りとり、なおかつまわりの石膏をできるだけ削らないように指示された。形成には時間制限を設けずに対象者が終了したと思うところまで行わせた。実験終了後、直視および口腔内カメラを使って窩洞形成した人工歯の重量を測定した。削り過ぎた石膏の重量と削り残したセメントの重量を算出し、2つの方法を比較した。正確に窩洞形成できるほど、削り過ぎと削り残しの材料の重量は少なくなるはずである。統計解析は2つの材料の重量をウィルコクソンの符号付順位和検定(有意水準5%)で行った。窩洞形成にかかった時間についても測定し、対応のあるT検定(有意水準5%)を行った。

【結果】削り過ぎた石膏の重量は直視と口腔内カメラを使った場合、それぞれ $62.7 \pm 21.1$ mg,  $69.6 \pm 26.2$ mgで有意差はなかった。削り残しのセメントの重量は直視と口腔内カメラを使った方法でそれぞれ $22.0 \pm 10.1$ mg,  $20.3 \pm 7.8$ mgで有意差はなかった。窩洞形成に要した時間については直視と口腔内カメラを使った方法でそれぞれ $355 \pm 81$ 秒,  $409 \pm 70$ 秒であり、口腔内カメラを使った方が有意に長い時間を必要とした。

【考察】今回の実験では直視による窩洞形成と口腔内カメラの映像を見ながら行う窩洞形成を比較しているが、トレーニング時間が大きく異なる。直視で窩洞形成をトータル30時間行ったのに対して、口腔内カメラは2時間30分だった。それでも実験の結果、削り過ぎの石膏と削り残しのセメントの重量に有意差が認められなかった。そこから考えられることは口腔内カメラを使う窩洞形成は比較的短時間のトレーニングで合格レベルの正確性を得られるということである。窩洞形成に要する時間について口腔内カメラを用いる方が若干長かかったが、トレーニング時間が直視に比べてはるかに少ないことを考慮すると、口腔内カメラを使う窩洞形成は必ずしも長時間になるとは言えない。今後、実験の前提条件を一致させた研究を行う必要がある。

今回の実験では窩洞形成中の対象者の姿勢に大きな違いが見られた。口腔内カメラの映像を見ながら行う窩洞形成では背筋がのびた良い姿勢を保っていたのに対して、直視での窩洞形成では大きく姿勢を崩し極端に前かがみになっていた。つまり診療姿勢に関しては口腔内カメラを用いる方法の方がはるかに優れていた。

【結論】口腔内カメラの映像を見ながら行う左上第一大臼歯の窩洞形成はトレーニング時間が比較的短いにもかかわらず、長時間トレーニングした直視での窩洞形成と有意差のないレベルの正確性に達することが示された。

## ADAMTSL6 $\beta$ を介したマルファン症候群モデルにおける組織破壊機構の解析

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野

○折本 愛、二木 正晴、石河 真幸、半田 慶介、齋藤 正寛

### Analysis of tissue destruction mechanism by ADAMTSL6 $\beta$ in a Marfan syndrome mice model.

Department of Restorative Dentistry, Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Ai Orimoto, Masaharu Futagi, Masaki Ishikawa, Keisuke Handa, Masahiro Saito

#### 【背景】

ADAMTSL6 $\beta$ は ADAMTS super family に属する細胞外マトリックス (ECM) でオキシタラン線維の主成分である fibrillin-1 (Fbn-1) の重合に関与している。これまで我々は、Fbn-1 の遺伝子変異が原因でおこるマルファン症候群 (Marfan's syndrome; MFS) のモデルマウスを用いて、ADAMTSL6 $\beta$ が歯根膜で崩壊されたオキシタラン線維を修復する作用を有している事を見出した。しかし ADAMTSL6 $\beta$ を介したオキシタラン線維の重合促進作用に関して、どのような ECM ネットワークを介してオキシタラン線維形成を誘導しているかは不明な点が多い。近年、同じく ADAMTS super family に属する ADAMTS メタロプロテアーゼと ADAMTSL6 $\beta$ が結合する事が報告され、これらの分子の複合体がオキシタラン線維の形成機構に関与している事が報告された。そこで本研究では、MFS のモデルマウスを用いて、ADAMTSL6 $\beta$ が誘導するオキシタラン線維形成促進作用に関して、同症候群の主たる死因である解離性大動脈瘤への関与が報告されている ADAMTS4 に及ぼす影響を、組織破壊が進行する平滑筋層で解析した。

#### 【方法】

1. C1039G/TSL6 $\beta$ -TG の作製: 解離性大動脈瘤を発症する MFS モデルマウス (C1039G) に、ADAMTSL6 $\beta$  を全身で過剰発現する transgenic マウス (TSL6 $\beta$ -TG) を交配したモデルマウス (C1039G/TSL6 $\beta$ -TG) を作製した。解離性大動脈瘤の解析は、心エコー (小動物用超音波高解像度イメージングシステム、プライムテック) および大動脈弓部の血管平滑筋層を HE 染色および Elastica van Gieson (EVG) 染色にて解析した。
2. Versican 分子の発現解析: ADAMTSL6 $\beta$ 、ADAMTS4 および ADAMTS4 の基質である Versican G1 domain Fragment (VG1F) の抗体を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。
3. 組換え ADAMTSL6 $\beta$ 、ADAMTS4 の精製: His-Tag を付加した ADAMTSL6 $\beta$ 、ADAMTS4 の発現ベクターを浮遊旋回培養可能な 293F 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養後の上清を Ni-NTA 担体を使用し精製を行った。
4. ADAMTSL6 $\beta$  と ADAMTS4 の結合解析: 組換え ADAMTSL6 $\beta$ 、ADAMTS4 添加後のマウス血管平滑筋細胞に対する免疫染色と、これらのタンパク質を用いた Pull-down assay により解析した。

#### 【結果】

C1039G/TSL6 $\beta$ -TG マウスに関して、C1039G と比較して Fbn-1 陽性のオキシタラン線維形成は促進されるものの、解離性大動脈瘤を引き起こす大動脈弓部の血管平滑筋層において、生後 3 ヶ月から 8 ヶ月にかけて弾性板の菲薄化と崩壊の促進が HE および EVG 染色で観察された。また心エコー解析から C1039G と比較して C1039G/TSL6 $\beta$ -TG は解離性大動脈瘤で見られる大動脈弓部は拡張していた。組織破壊状況を調べると、C1039G/TSL6 $\beta$ -TG の大動脈弓部では ADAMTS4 の発現上昇に伴い VG1F の蓄積が亢進していた。また、TSL6 $\beta$ -TG マウスにおいて、強発現した ADAMTSL6 $\beta$  陽性のオキシタラン線維上で ADAMTS4 と局在が一致し、VG1F の蓄積も亢進していた。そこで次に、ADAMTSL6 $\beta$  と ADAMTS4 の組換えタンパク質をマウス血管平滑筋細胞に添加すると、ADAMTSL6 $\beta$  により誘導されたオキシタラン線維上に ADAMTS4 が取り込まれることと、さらに Pull-down assay の結果、ADAMTSL6 $\beta$  と ADAMTS4 は直接結合することが明らかになった。

#### 【結論】

本研究によって ADAMTSL6 $\beta$  は ADAMTS4 との直接結合を介して Fbn-1、Versican 複合体を分解することを明らかにした。またこの現象は、MFS の解離性大動脈瘤において組織破壊に促進的に働くことが示唆された。今後、MFS の歯周炎ならびに解離性大動脈瘤予防の目的に ADAMTSL6 $\beta$  をオキシタラン線維の形成不全を予防する新たな創薬として開発するためには、ADAMTSL6 $\beta$  と ADAMTS4 結合機構を解明し、組織破壊を誘導しない正常なオキシタラン線維再生能を有する ADAMTSL6 $\beta$  製剤の技術開発が必要になることが示唆された。

**Pannexin 3 は細胞内 ATP と Ca<sup>2+</sup>濃度を調整する、骨芽細胞分化の新規制御因子である**

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野  
○石河 真幸、齋藤 正寛

**Pannexin 3 functions as an ER Ca<sup>2+</sup> channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation.**

Department of Restorative Dentistry, Division of Operative Dentistry,  
Tohoku University Graduate School of Dentistry  
○Masaki Ishikawa, Masahiro Saito

【背景】 歯、軟骨および骨などの硬組織では、原基細胞が種々の因子による相互作用と制御によって増殖、分化し、適当な大きさと機能をもった器官へと形成される。これらの過程において数々の因子の関与が報告されているが、前駆細胞の増殖からの細胞周期離脱、分化過程を総合的に制御する因子の研究が進められている。また、そのような因子の機能が制御できなくなると様々な病態を引き起こすことも明らかにされつつあり、歯周病や根尖病巣を引き起こす慢性炎症や細胞死に関わる事も予想されている。私どもはマウス新生児の歯の cDNA ライブラリーから、硬組織形成に必須である候補因子として Pannexin 3 (Pannx3) を同定した。Pannx3 は新規の Gap junction protein family に属する Pannx family (Pannx1-3) のメンバーで、4 回膜貫通型の膜タンパクである。近年、Pannx1 の hemichannel を介した ATP release が macrophage の遊走、活性化することで炎症を躍起することが報告されていることから、Pannx3 も同様の機能を有する事が示唆されている。そこで本研究では、Pannx3 の発現パターンや機能解析を行い、Pannx3 の機能不全または恒常性破壊を起因とした病態の解明、特に歯周炎や根尖性歯周炎に深く関与する慢性炎症への関係性の明らかにすること目的とする。

【方法】

1. 免疫染色: 骨組織における Pannx3 の発現を確認する為に、Pannx3 抗体を用いて組織標本における免疫染色を行い、confocal microscope にて観察した。
2. Pannx3 の in vitro および ex vivo での機能解析: Pannx3 発現 vector および shRNA を骨細胞系細胞株 C2C12 cells や初代骨芽細胞に transfection し、qPCR および ALP または Alizarin Red 染色にて細胞の分化を観察した。また、Adenovirus Pannx3 および Pannx3 antigen-peptide を用いて中足骨の組織培養を行い、time lapse により骨成長を観察した。
3. Pannx3 の channel 機能解析: Hemichannel の機能を調べる為に、Pannx3 を強発現させた C2C12 cells の細胞内 ATP の細胞外への放出能を Luminometer により観察した。Pannx3 ER Ca<sup>2+</sup> channel の機能解析の為に、Pannx3 強発現 C2C12 cells に対して Ca<sup>2+</sup> indicator, Fura-2 を用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した。Gap junction の機能を調べる為に、Pannx3 強発現 C2C12 cells に Ca<sup>2+</sup> indicator Fluo-4 および NP-EGTA (Caged Ca<sup>2+</sup>) を作用させて Ca<sup>2+</sup> wave を confocal microscope で観察した。

【結果】 Pannx3 は硬組織、特に歯、軟骨および骨に発現することを免疫染色および Northern blotting により明らかにした。さらに、Pannx3 は骨細胞系細胞株 C2C12 cells、初代骨芽細胞および中足骨の組織培養を用いた機能解析により骨の成長を促すことがわかった。その分子機構は、骨芽細胞分化過程において細胞と細胞外基質をつなげる Pannx3 hemichannel から放出した細胞内 ATP が purinergic 受容体に結合し、PI3K/Akt signaling を活性化することがわかった。PI3K/Akt signaling は小胞体膜にある Pannx3 ER Ca<sup>2+</sup> channel の Ca<sup>2+</sup>放出を促し、細胞間にある Pannx3 gap junction の機能を介して近隣細胞に波及し、また細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることで Calmodulin signaling を活性化させることも示唆された。これらの結果より、Pannx3 は細胞内 Ca<sup>2+</sup>調節機構を介して骨芽細胞分化マーカーの発現調節が行われることが明らかになった。

【結論】 Pannx3 は相互活性調整機構をもつ 3 機能 (hemichannel、ER Ca<sup>2+</sup> channel、gap junction) を介して骨芽細胞分化を促進する新規制御因子であることが示唆された。また、既に報告がある Pannx1 と同様に、Pannx3 の ATP release も組織依存的に炎症を躍起する起因因子になることが十分予想される。このように Pannx3 は歯周炎または根尖性歯周炎の病態への理解および骨再生を目的とした創薬への応用が期待できる。今後、これら病態における Pannx3 の機能のさらなる解析を行い、Pannx3 をターゲットとした新医療ツールの開発に挑んでいきたい。

## アメロジェニンが炎症過程におけるマクロファージの形質転換におよぼす影響

九州大学大学院 歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野  
○山道研介<sup>1)</sup>、福田隆男<sup>1)</sup>、讃井彰一<sup>1)</sup>、豊田敬介<sup>1)</sup>、後村亮<sup>1)</sup>、西村英紀<sup>1)</sup>

### The effect of amelogenin on the modulation of macrophage phenotype during inflammatory responses.

<sup>1)</sup>Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○Kensuke Yamamichi<sup>1)</sup>, Takao Fukuda<sup>1)</sup>, Terukazu Sanui<sup>1)</sup>, Kyosuke Toyoda<sup>1)</sup>, Ryo Atomura<sup>1)</sup>, and Fusanori Nishimura<sup>1)</sup>

#### 【目的】

歯周組織の再生にエナメル基質タンパク質 (EMD: Emdogain Gel) が用いられているが、異種蛋白であることから、EMD 成分のどの分子がいかなる作用で再生を促進するかについて、詳細に解明することは極めて重要な課題である。しかし、長年 EMD の作用機序の解明を試みる研究が続けられてはいるにもかかわらず、歯周組織再生・歯肉上皮の down growth 阻害・抗炎症作用などに対するシグナル伝達分子レベルでの統一的な見解は得られていない。一方、EMD による歯周外科処置に、疼痛・腫脹の軽減を伴う治癒促進効果があることが経験的に知られている。実際アメロジェニンが炎症性/抗炎症性サイトカイン産生の面から抗炎症作用を示す報告が存在する (Almqvist *et al.*, 2012. *Cytokine*)。本研究ではアメロジェニンの免疫応答に及ぼす影響を検討することを目的とし、マイクロアレイ解析によりマクロファージ株におけるアメロジェニン刺激が関与する遺伝子群について網羅的解析を行った。

#### 【材料及び方法】

1. 使用細胞：ヒト単球系細胞株 U-937 をフォルボールエステル (PMA: 50 nM) で 24 時間刺激し、マクロファージへ分化誘導を行った。
2. アメロジェニンの精製：マウス胎児 cDNA より GST 融合アメロジェニンを作成後、on column 精製した。
3. マイクロアレイによる変動遺伝子の網羅的解析：U-937 細胞を amelogenin (10 µg/mL), LPS (50 ng/mL), LPS + Amelogenin の各群で 0, 4, 8, 12, 24 時間の time course で刺激後、total RNA を抽出し、各時間における遺伝子発現をマイクロアレイ (illumina 社 HumanHT-12 v4chip) により網羅的に解析した。
4. ヒートマップ解析：GO 解析により炎症関連遺伝子を抽出し Amelogenin 刺激特異的な遺伝子発現変動を確認した。
5. マイクロアレイ解析の検証：Amelogenin 刺激特異的に亢進していた代表的炎症関連遺伝子・抗炎症関連遺伝子について Real-time PCR 法・Western Blotting 法・ELISA 法を用いてマイクロアレイの再現性を確認した。
6. マクロファージの表現形の確認：M2 型(創傷治癒型)マクロファージのマーカーである Arginase1 の発現及び、細胞の形態変化について共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察した。

#### 【結果】

1. ヒートマップ解析において、LPS + Amelogenin 刺激で特異的に増幅していた抗炎症関連遺伝子 TSG-6、抗酸化関連遺伝子 SOD2、代表的炎症関連遺伝子 IL-6、TNF-α について遺伝子発現の増幅と蛋白質発現の亢進を確認した。
2. 共焦点レーザー顕微鏡において、LPS 刺激では M1 型に特徴的な円状の細胞形態を呈したのに対し、Amelogenin 刺激においては IL-4 刺激で誘導した M2 マクロファージと同様に、Arginase1 の発現及び紡錘形への細胞形態の変化を確認した。

#### 【考察】

マクロファージ分化した U-937 細胞において、アメロジェニン刺激で炎症・抗炎症作用の両方が活性化される事が示唆される一方、TSG-6 に代表される抗炎症遺伝子の著明な増幅が確認された。また、ヒートマップ解析により炎症・抗炎症関連遺伝子における経時変化の傾向が確認できたことから、アメロジェニン刺激は炎症の早期には炎症を促進し、後期には抗炎症作用を促進する可能性が示唆され、さらに、M2 マクロファージへの分化を促進している可能性が示された。現在、アメロジェニンによる抗炎症・抗酸化作用の分子基盤についてさらに詳細に検討を進めている。

#### 【結論】

ヒトマクロファージ様細胞株 U-937 において、アメロジェニン刺激は、抗炎症・抗酸化作用及び、M2 マクロファージへの分化促進作用があることが示唆された。

## 日本人侵襲性歯周炎患者のヒトエクソーム解読と遺伝子多型解析

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)  
○北垣次郎太、宮内静香、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也

### Identification of genetic risk factor for aggressive periodontitis in Japanese population

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
○Jirouta Kitagaki, Shizuka Miyauchi, Motozo Yamashita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura,  
Shinya Murakami

#### <目的>

侵襲性歯周炎は、若年者に発症し急速な歯周組織破壊を認める歯周炎で、その罹患率は1000-2000人に1人である。疾患発症の病因論として、慢性歯周炎とは異なり家族内集積を認めることから、侵襲性歯周炎の発症には遺伝的要因が関与していると考えられている。炎症性サイトカイン等の一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) が疾患発症要因の一つである可能性が示唆されているが、詳細は依然として不明なままである。これまでの侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索は、機能が既に報告されている単一遺伝子の遺伝子多型解析にとどまり、網羅的な遺伝子多型解析を行っていないことが本疾患の疾患関連遺伝子の解明に至っていない原因と考えられる。そこで本研究では、ゲノムワイドアプローチによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索を行った。

#### <方法および結果>

大阪大学歯学部附属病院を受診し侵襲性歯周炎と診断された患者のうち、本研究への参加を応諾された患者57名の血液を採取した (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号533)。侵襲性歯周炎患者の平均年齢は32.35歳、平均歯周ポケット値は4.20mm、4mm以上の歯周ポケットの割合は51.17%、歯周組織の平均炎症面積 (PISA: Periodontal Inflamed Surface Area) は1263.89mm<sup>2</sup>で、Scheiのルーラーを用いた歯槽骨の平均吸収度は37.61%であった。血液よりゲノムDNA抽出後にエクソーム解析を実施し、遺伝子多型解析を行ったところ、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として、Gタンパク質共役受容体 (GPR126: G protein-coupled receptor 126) の新規 SNP (c.3086 G>A, p.Arg 1029 Gln) を同定した。疾患群でのマイナー対立遺伝子頻度 (MAF: Minor allele frequency) が1.754%であったのに対し、日本人の遺伝子リファレンスライブラリーデータベースにおける対照群でのMAFは0.274%であり、p値は0.0136、オッズ比は6.49、95%信頼区間は1.18~35.83となり、SNPの出現頻度に統計学的有意差を認めた。

GPR126のノックアウトマウスで四肢形成に異常が認められることや、ゲノムワイドアプローチによりGPR126が思春期特発性側弯症の原因遺伝子の一つであることが報告されていることから、GPR126が硬組織形成に重要な役割を担っていることが推測される。そこで次に、歯根膜細胞の分化におけるGPR126の影響を検討した。ヒト歯根膜細胞 (HPDL: Human periodontal ligament cells) に野生型GPR126もしくは、新規SNPを含んだ変異型GPR126を遺伝子導入し、β-グリセロリン酸 (5 mM) とアスコルビン酸 (50 μg/ml) を含むαMEM培地にて4日間石灰化誘導した後に、GPR126のシグナル下流因子cAMPの発現をELISAにて、Runx2、骨シアラタンパク、オステオポンチン、BMP-7の発現をリアルタイムPCRにてそれぞれ検討した。その結果、HPDLにおいて野生型GPR126はcAMPの発現を上昇させ、石灰化関連因子の発現を上昇させた。一方、変異型GPR126が遺伝子導入されたHPDLではcAMPの発現上昇ならびに石灰化関連因子の発現上昇は認められなかった。

#### <結論>

本研究では、ゲノムワイドアプローチを用いた日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索を行った。その結果、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子としてGPR126を同定した。また、野生型GPR126はHPDLの分化を促進させたが、新規SNPを含んだ変異型GPR126を過剰発現させたHPDLでは、分化の促進が認められなかった。以上の結果より、新規SNPによりGPR126のシグナル伝達が抑制されると、GPR126誘導性のBMP-7の発現上昇を介した石灰化関連因子の発現上昇認められないことが明らかとなった。その結果、GPR126依存性の歯根膜組織の恒常性維持が破綻をきたし、侵襲性歯周炎が惹起されると考察される。

## 大規模並列シーケンサーを用いた侵襲性歯周炎のゲノム解析

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野<sup>1</sup>

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 疾患多様性遺伝学分野<sup>2</sup>

東京医科歯科大学 疾患バイオリソースセンター<sup>3</sup>

○須藤 毅頭<sup>1,2</sup>、岡田 随象<sup>2</sup>、小林 宏明<sup>1</sup>、御給 美沙<sup>1</sup>、田中 敏博<sup>2,3</sup>、和泉 雄一<sup>1</sup>

**Genetic analysis of aggressive periodontitis using a massively parallel sequencer**

Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University<sup>1</sup>

Department of Human Genetics and Disease Diversity, Graduate School of Medi-  
cal and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University<sup>2</sup>

Bioresource Research Center, Tokyo Medical and Dental University<sup>3</sup>

○Takeaki Sudo<sup>1,2</sup>, Yukinori Okada<sup>2</sup>, Hiroaki Kobayashi<sup>1</sup>, Misa Gokyu<sup>1</sup>, Toshihiro Tanaka<sup>2,3</sup>, Yuichi Izumi<sup>1</sup>

### 【背景】

侵襲性歯周炎は急速な歯周組織の破壊をきたす特殊な歯周炎であり、早期に骨吸収を引き起こし、歯の喪失を招く。この疾患の特徴として、全身的に健康であること、急速な組織破壊を引き起こすこと、家族集積性があることがあげられる。侵襲性歯周炎は、罹患率の低さと家族集積性から遺伝子変異の関与が示唆されており、炎症性サイトカイン遺伝子などの1塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms : SNPs) の解析を中心とした候補遺伝子アプローチによる探索が行われてきたが、原因遺伝子の同定には至っていない。全エクソーム解析は、大規模並列シーケンサーを用いた網羅的な塩基配列決定法であり、遺伝子疾患の原因遺伝子同定に数多く利用されている。本研究では侵襲性歯周炎患者における大規模並列シーケンサーを用いたエクソーム解析を、多くの遺伝情報を共有する家系内で行い、侵襲性歯周炎の発症進行に関与するゲノム解析を行うことを目的とした。

### 【方法】

東京医科歯科大学歯学部附属病院の歯周病外来を通じて収集された侵襲性歯周炎 2 家系を対象とし、侵襲性歯周炎罹患患者 5 名および非罹患患者 1 名について、末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて Ion Proton による全エクソーム解析を行った。得られた遺伝子変異に対して、下記の filtering を実施した。(1) 低 depth 変異の除去、(2) Insertion/deletion の除去、(3) 罹患者に共通した変異以外の除去、(4) 同義置換の除去、(5) 公共データベース (Human Genetic Variation Browser、1000-genome database、NHLBI Exome Sequence Project) に登録され頻度 1% 以上のコモンバリエーションの除去。絞り込まれた変異の確認をサンガーシーケンシング法にて行った。本研究は、東京医科歯科大学 歯学部倫理審査委員会の承認を得た後、実施された (倫理承認番号 : 890)。

### 【結果】

エクソームシーケンシングにより、約 50,000 個の遺伝子変異を各サンプルにおいて同定し、filtering を通じて家系毎にそれぞれ 41 変異、379 変異に絞り込んだ。2 家系に共通して変異を認める変異候補遺伝子が存在しており、これらの変異はサンガーシーケンシングにおいて確認された。

### 【考察】

エクソーム解析により、侵襲性歯周炎の原因候補遺伝子を同定した。他の侵襲性歯周炎患者を対象として本遺伝子の変異を検索する予定としている。



## マウス骨髄由来新規間葉系幹細胞集団における神経分化能の解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)  
○伊藤祥作, 山内裕香子, 山本由美子, 成瀬陽菜, 伊藤勇紀, 林美加子

### The analysis of a new murine mesenchymal population for neural differentiation.

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
○ITO SHOUSAKU, YAMAUCHI YUKAKO, YAMAMOTO YUMIKO, NARUSE HARUNA, ITOH YUKI, HAYASHI MIKAKO

#### 【研究目的】

象牙質・歯髄複合体を構成する細胞集団は歯髄腔内に存在する間葉系幹細胞に由来すると考えられている。しかしながら、この間葉系幹細胞については、未だ単離には成功しておらず不明な点が多い。間葉系幹細胞は、歯髄のみならず骨髄にも存在することがわかっている。そこで我々はマグネティックビーズを用いた簡便な精製法によりマウス骨髄細胞から間葉系幹細胞の濃縮に成功したことを本学会 2009 年度秋季学術大会 (第 131 回) にて報告した。そして、その新規幹細胞集団 (HipOP: High purified osteoprogenitors) は、高い硬組織再生能を持っていることがわかっている。今回、我々は新規幹細胞集団の神経細胞への分化能について解析し、新しい知見が得られたので報告する。

#### 【材料と方法】

- 1) マウス骨髄 (C57BL/6J) から骨髄細胞を調整し、10%FBS 含有  $\alpha$ MEM 中で培養する。培養 3 日目に PBS にて浮遊細胞を除去する。2 週間培養の後、トリプシン・EDTA 処理により付着細胞を回収する (骨髄ストローマ細胞: BMSCs)。
- 2) 回収した骨髄ストローマ細胞と、血球系細胞のマーカー分子に対する抗体 (抗 CD5、抗 CD45、抗 CD11b、抗 Gr-1、抗 7-4、抗 Ter-119、抗 CD45R) を結合したマグネティックビーズとを反応させる。反応後、細胞をマグネティックカラムに注入し、カラムから流出してきた細胞を回収する (新規幹細胞集団: HipOPs)。
- 3) HipOPs を非接着性基材上で、bFGF (40ng/ml) と EGF (20ng/ml) を含む DMEM/F12 培地にて培養した。
- 4) 形成された神経細胞塊 (Neurosphere) を蛍光免疫染色法にて Nestin の発現を確認した。さらに、形成された Neurosphere を回収し、bFGF (40ng/ml) と EGF (20ng/ml) を含む DMEM/F12 培地にて継代培養をおこなった。
- 5) BMSCs および HipOPs を bFGF と EGF 存在下にて 1 週間培養したのち、それぞれに含まれる神経前駆細胞の割合について Limiting dilution 法にて評価した。

#### 【結果】

- 1) 間葉系幹細胞集団 HipOPs は、bFGF および EGF 存在下で Neurosphere を形成した。この Neurosphere は神経前駆細胞マーカーである Nestin 陽性であることがわかった。
- 2) Limiting dilution 解析の結果、BMSCs に含まれる神経前駆細胞の割合が 1/50000 であったのに対し、HipOPs に含まれる神経前駆細胞の割合は 1/400 であった。つまり、HipOPs は 120 倍以上神経前駆細胞が濃縮された幹細胞集団であることがわかった ( $t=36.1$ ,  $p<0.0001$ )。

#### 【結論】

新規幹細胞集団 (HipOPs) は、高い神経分化能をもつ幹細胞集団であることが明らかとなった。本研究結果から、HipOPs は、硬組織のみならず神経組織の再生にも有用であることが示唆された。

## TNF- $\alpha$ 誘導性 NF- $\kappa$ B シグナルは象牙芽細胞様細胞の石灰化能を阻害する

九州歯科大学口腔保存治療学分野<sup>1</sup>、ながよし歯科<sup>2</sup>  
○中山皓平<sup>1</sup>、平田-土屋志津<sup>1</sup>、永吉雅人<sup>2</sup>、諸富孝彦<sup>1</sup>、北村知昭<sup>1</sup>

**The Effect of NF- $\kappa$ B Signalling on Odontoblast-like Cells**  
Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University<sup>1</sup>  
Nagayoshi Dental Clinic<sup>2</sup>

○NAKAYAMA Kohei<sup>1</sup>, HIRATA-TSUCHIYA Shizu<sup>1</sup>, NAGAYOSHI Masato<sup>2</sup>, MOROTOMI Takahiko<sup>1</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>

### 【目的】

歯髄最表層に配列している象牙芽細胞の主要な機能は象牙質形成であるが、歯髄における炎症応答にも関与していることが知られている。炎症性サイトカインのひとつである腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )は炎症早期から産生され、様々な炎症性サイトカインを誘導するとともに、炎症時の重要なシグナル伝達経路である NF- $\kappa$ B シグナルを亢進する。しかしながら、象牙芽細胞の炎症応答における TNF- $\alpha$  誘導性 NF- $\kappa$ B シグナルの役割については十分に明らかにされていない。本研究では、象牙芽細胞の特徴を有するラット下顎切歯歯髄由来細胞株 KN-3 における TNF- $\alpha$  誘導性 NF- $\kappa$ B シグナルと石灰化能との関係について検討した。

### 【材料と方法】

KN-3 細胞にアスコルビン酸及び $\beta$  グリセロリン酸を加えた状態で、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ の存在下・非存在下において、細胞増殖能に対する影響を調べるために WST-8 アッセイを行った。また、石灰化能に及ぼす影響はアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定と Alizarin red S 染色で確認した。次に、NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入した KN-3 細胞を TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)で 12 時間刺激後にルシフェラーゼ活性を測定し、NF- $\kappa$ B の転写活性を検討した。さらに、炎症関連性マーカーであるインターロイキン 6、8(IL-6、8)、マトリックスメタロプロテアーゼ 9(MMP-9)の発現をリアルタイム RT-PCR 法により確認した。最後に、TNF- $\alpha$ 刺激した KN-3 細胞に NF- $\kappa$ B シグナル阻害剤である BAY11-7082 (1 nM~1  $\mu$ M) を加え、石灰化能に対する NF- $\kappa$ B シグナル阻害の影響を ALP 活性の測定と Alizarin red S 染色により検討した。

### 【結果】

TNF- $\alpha$ 刺激は KN-3 細胞の増殖能には影響を与えなかったが、石灰化能の指標である ALP 活性と Alizarin red S 染色は TNF- $\alpha$ 濃度依存的に抑制された。一方、NF- $\kappa$ B の転写活性は TNF- $\alpha$ 濃度依存的に上昇するとともに、IL-6、IL-8、および MMP-9 の発現上昇が認められた。さらに、TNF- $\alpha$ 刺激によって抑制された ALP 活性および Alizarin red S 染色は、BAY11-7082 濃度依存的にその抑制が解除された。

### 【考察】

以上の結果より、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ は象牙芽細胞の石灰化能を抑制すること、また、その抑制は NF- $\kappa$ B シグナルを阻害することで解除されることが示唆された。

### 【結論】

TNF- $\alpha$ は NF- $\kappa$ B シグナル経路を介して象牙芽細胞様細胞株 KN-3 の石灰化能を抑制する。

## ヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞において IL-1 $\beta$ 誘導 MMP-13 は Wnt16 シグナルを介して細胞増殖を調節する

○ 檜山太希, 尾関伸明, 山口秀幸, 長谷奈央子, 川合里絵, 茂木真希雄\*, 中田和彦  
愛知学院大学歯学部歯内治療学講座  
\*愛知学院大学薬学部生体機能化学講座

### IL-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-13-regulated proliferation of osteoblastic cells-derived from human skeletal muscle stem cells mediated by Wnt16 signaling pathway

○ Taiki Hiyama, Nobuaki Ozeki, Hideyuki Yamaguchi, Naoko Hase, Rie Kawai, Makio Mogi\* and Kazuhiko Nakata  
Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
\*Department of Medicinal Biochemistry, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

#### 【研究目的】

これまでに我々は,  $\alpha 7$  integrin 陽性ヒト骨格筋幹細胞を用いた骨芽細胞分化誘導法を確立し, このヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞を fluorescence activated cell sorting (FACS) により高純度化する方法を構築した (Ozeki N. et al., *Exp Cell Res.* 2006, 2014). さらに, このヒト骨芽細胞の炎症性サイトカイン添加における細胞増殖については, 内在の a disintegrin and metalloprotease (ADAM) -28 および matrix metalloproteinase (MMP) -13 の発現が必須であり, これらふたつのタンパク質を含んだ細胞増殖に繋がるユニークなシグナルカスケードの存在を明らかにした. 近年, 骨芽細胞分化誘導関連因子として Wnt シグナル伝達経路が注目されている. Wnt シグナル伝達経路は胚発生, 形態形成や癌などに関連するタンパク質ネットワークで, Wnt の関与するシグナル伝達経路として,  $\beta$ -カテニンを介したカノニカル経路, PCP 経路 (Wnt/JNK 経路), Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  経路の3種類が知られている. 興味深いことに Moverare ら (*Nat Med.* 2014) は, 骨芽細胞分化に Wnt16 が関与すること, さらに我々は, induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) 由来高純度象牙芽細胞を用いた同様の実験系で, サイトカイン誘導による細胞増殖が, Wnt5 シグナルを介することを明らかにした (Ozeki N. et al., *Exp Cell Res.* 2014).

そこで本研究では, ヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞の炎症性サイトカイン interleukin (IL) -1 $\beta$  で誘導される細胞増殖における, Wnt16 と MMP-13 の新規な生理的役割を明らかにするため, siRNA を用いて詳細な検討を行った.

#### 【材料および方法】

ヒト骨格筋幹細胞を用いて新規に確立した骨芽細胞分化誘導法により, 高純度に骨芽細胞に分化誘導させた後, Real time-PCR 法と Western Blot 法により IL-1 $\beta$  誘導 Wnt16 と MMP-13 発現を評価した. さらに培養液中の MMP-13 活性は, 特異的 MMP-13 抗体にて免疫沈降後, 酵素活性を評価した. IL-1 $\beta$  による細胞増殖は BrdU 標識 cell proliferation ELISA により評価した. Wnt16 および MMP-13 siRNA を用いた遺伝子のノックダウンにより, ヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞の増殖過程における Wnt16 と MMP-13 のシグナルカスケードの検索を行った.

#### 【結果】

ヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞において, IL-1 $\beta$  誘導 Wnt16, MMP-13 遺伝子発現および MMP-13 活性上昇がコントロールと比較して統計学的有意 ( $P < 0.01$ ) に認められた. Wnt16 および MMP-13 siRNA 処理により, IL-1 $\beta$  による細胞増殖の抑制が惹起され, コントロールと比較して統計的有意差 ( $P < 0.01$ ) が認められた. さらに, siRNA を用いたシグナルカスケードの検索により, IL-1 $\beta$  による細胞増殖は Wnt16  $\rightarrow$  MMP-13 シグナルカスケードを介して制御されていることが明らかとなった.

#### 【考察および結論】

ヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞中の IL-1 $\beta$  誘導 MMP-13 は, Wnt16 シグナルを介して MMP-13 タンパク質を誘導し, 細胞増殖を調節することが示唆された. これまでに我々は, マウスならびにヒト純化象牙芽細胞中の MMP-3 により, 細胞増殖が制御されること, またその制御は Wnt5 の遺伝子ならびにタンパク質発現を伴うことを明らかにした. 今回, IL-1 $\beta$  による骨芽細胞と象牙芽細胞の増殖が, 種類は異なるとはいえ Wnt ならびに MMP の産生誘導を介した特異的なシグナルカスケードを持つことを明示できたことから, この細胞増殖誘導機構についてさらに検討中である.

## 高周波電流刺激によるラット頭蓋骨欠損部への骨再生

北海道大学 大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学<sup>1)</sup>、とみなが歯科<sup>2)</sup>  
○佐藤賢人<sup>1)</sup>、菅谷 勉<sup>1)</sup>、中谷充宣<sup>1)</sup>、工藤 愛<sup>1)</sup>、前田良子<sup>1)</sup>、猪俣慶久<sup>1)</sup>、川浪雅光<sup>1)</sup>、富永敏彦<sup>2)</sup>

### Bone regeneration in rat calvarial defects by high-frequency electric stimulation

Department of Periodontology and Endodontology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University<sup>1)</sup>  
Tominaga Dental Clinic<sup>2)</sup>

○Takahito Sato<sup>1)</sup>、Tsutomu Sugaya<sup>1)</sup>、Mitunori Nakatani<sup>1)</sup>、Megumi Kudo<sup>1)</sup>、Nagako Maeda<sup>1)</sup>、  
Yoshihisa Inomata<sup>1)</sup>、Masamitsu Kawanami<sup>1)</sup>、Toshihiko Tominaga<sup>2)</sup>

【諸言】 骨再生を促進する電流刺激法や電磁波刺激法として、直流刺激、交流刺激、パルス電磁波刺激、静電結合型電磁波刺激などが報告されており、一部は難治性の骨折等に臨床応用されている。一方、高周波電流装置は根管の無菌化等に用いられており、近年、無菌化だけでなく、骨芽細胞の活性化や根尖病変の治癒促進など、骨形成への効果も示唆されている。本研究の目的は、高周波電流刺激が骨再生を促進するかを病理組織学的に検討することである。

【材料と方法】 Wistar系ラット(9週齢)17匹の頭皮を切開、剥離して骨膜を切除後、外径4.8mmのトレフィンバーを用いて頭蓋骨に骨欠損を2か所作製した。高周波電流刺激を与えないラットを対照群とし、高周波電流刺激を与えるラットでは、左側の骨欠損を刺激群として欠損中央部にφ0.1mmの能動電極を設置し、対極は能動電極から左側に10mm離れた皮膚に刺入した。右側の骨欠損は能動電極を設置しない非刺激群とした。電流刺激として、左側の骨欠損に生理食塩水を満たし500kHz、Duty70%の高周波電流を1.0秒間通電し、これを5回繰り返した。なお、過熱を避けるため生理食塩水は通電ごとに交換した。刺激群には4,7,11日後にも経皮的に骨欠損部に能動電極を刺入して、同様に高周波電流を1.0秒間、5回通電した。

8週後に頭蓋骨を摘出、ホルマリンで固定、μCT撮影を行って画像を3次元構築し、硬組織の形成率を計測した。さらに、脱灰薄切標本を作製してヘマトキシリン-エオジン染色を行い、骨欠損の長さや新生骨の長さを計測、新生骨形成率を求めた。計測には骨欠損中央部とその前後0.5mmおよび1.0mmの標本を用いた。

計測結果はSPSSを用いてKruskal-Wallis検定、Mann-Whitney U検定を行った。なお、本実験は北海道大学動物実験委員会の承認を得て行った。

【結果】 μCTによる硬組織形成率は対照群が12.6±6.2%、刺激群が56.6±16.4%、非刺激群が33.0±11.2%で、刺激群と非刺激群は対照群より有意(p<0.005)に高く、また刺激群は非刺激群よりも有意(p<0.005)に高かった。

刺激群と非刺激群の新生骨は母床骨よりやや薄く、一部は未熟で、新生骨周囲には多くの骨芽細胞がみられた。母床骨切断面付近の骨細胞に萎縮、消失等は認められなかった。また、一部の標本では新生骨が欠損部のみではなく母床骨の上部や下部、母床骨とは連続せずに骨欠損部に孤立して形成されていた。

組織計測による新生骨形成率は、対照群では12.7±4.6%、刺激群が56.7±16.7%、非刺激群38.0±11.2%で刺激群と非刺激群は対照群より有意(p<0.005)に高く、刺激群は非刺激群より有意(p<0.05)に高かった。

【考察】 高周波電流刺激により高い骨再生効果が認められたが、能動電極を設置しなかった非刺激群でも骨再生が促進されたことから、今回の通電条件より低いエネルギー量でも骨再生効果があると考えられ、電流量や通電時間、通電回数、或いは空中伝播する電磁エネルギーなどを検討することで、より効果を高めることが可能と思われた。また、高周波電流刺激により骨再生が促進されるメカニズムは今のところ不明であり、今後解明すべき点は多いものの、今回用いた周波数は人体に障害はほとんどないと考えられること、他の再生療法などと組み合わせることも可能であることから、今後の発展が期待できる。

【結論】 高周波電流刺激によりラット頭蓋骨欠損部での骨再生が促進されることが明らかとなった。

## S-PRG フィラー抽出液の支台歯形成面被覆・象牙細管封鎖効果

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座う蝕学分野<sup>1</sup>, 山本歯科クリニック<sup>2</sup>,  
東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座歯髄生物学分野<sup>3</sup>

○山本信一<sup>1,2</sup>, 韓 臨麟<sup>1</sup>, 興地隆史<sup>3</sup>

Surface Coating and Dentinal Tubule-occluding Ability of S-PRG Filler Extract Solutions on Ground Human Dentin

<sup>1</sup>Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan; <sup>2</sup>Yamamoto Dental Clinic; <sup>3</sup>Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan,

○YAMAMOTO Shinichi<sup>1, 2</sup>, HAN Linlin<sup>1</sup>, OKIJI Takashi<sup>3</sup>

**研究目的:** Surface pre-reacted glassionomer filler (S-PRG フィラー) は、フッ化物 (F)、ストロンチウム (Sr)、ホウ素などの各種イオン徐放能を備えており、う蝕予防効果や静菌効果などを期待して種々の歯科材料に添加されている。一方、我々は S-PRG フィラー水中懸濁液の上清 (以下、S-PRG フィラー抽出液) を人工唾液と混和すると沈澱物が生じることを確認すると共に、人工脱灰象牙質面に同抽出液、次いで人工唾液を塗布すると表層が析出物で覆われることを観察している<sup>1)</sup>。本研究ではこの現象が象牙質形成面保護に応用可能かを確認する端緒として、支台歯形成された象牙質面に S-PRG フィラー抽出液と人工唾液との処理を行い、形成面被覆・象牙細管封鎖効果を検証した。

**材料および方法:** S-PRG フィラー抽出液 (固形物非含有; SF0; 松風社提供) および S-PRG フィラー50%含有のセラミック材 (SF50; 松風社提供) を被験材料とした。また、新鮮ヒト抜去大臼歯を被験歯とした (新潟大学歯学部倫理委員会承認済み)。被験歯の歯冠部に、全部被覆冠修復のための支台歯形成法に準じてダイヤモンドポイントにて象牙質に達する支台歯形成を行った。次いで、アクリル酸溶液 (10%) で歯面処理 (5 秒) し水洗した後、SF0 あるいは SF50 を 30 秒塗布してから、直ちに人工唾液中に 7 あるいは 28 日保管した。被験材料を塗布せず人工唾液中に同期間保管した歯を対照群とした。その後、ダイヤモンドディスクで象牙質塗布面 (近遠心、頬舌側および咬合面の 5 面) を切り取り観察試片とし、臨界点乾燥を行った後、走査電子顕微鏡 (SEM; 日立 2300) にて観察するとともに、単位面積あたりの象牙細管の総数に対する封鎖率を算出した。また、各試片縦断面における F, Sr, Ca の分布を波長分散型電子線マイクロアナライザー (EPMA; EPMA1610, 島津) で解析した。

**結果:** 対照群では象牙細管周囲に人工唾液中のミネラル成分と思われる析出物が観察されたが、象牙質の脱灰像や象牙細管の開口は明瞭であった。一方、SF0 もしくは SF50 塗布群では、粒子状析出物で象牙細管開口部が大部分封鎖されており、管間象牙質におけるコラーゲン線維の露出も観察されなかった。これらの変化は SF50 塗布群で SF0 塗布群より、また保管 28 日後で 7 日後と比較して顕著であった。象牙細管封鎖率は SF0, SF50 塗布群とも対照群より有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。EPMA により、SF0 もしくは SF50 塗布群で Sr, F が塗布面表層部 10-30  $\mu\text{m}$  の深さまで取り込まれたことが確認されるとともに、塗布群、対照群とも表層における Ca 濃度の僅かな上昇が観察された。

**考察:** 演者らは、S-PRG フィラー抽出液と人工唾液との混和により形成された析出物の組成の解析から、その形成機序として両者に含まれるイオン間の化学反応による錯塩形成などを推定している<sup>1)</sup>。今回の観察の結果、SF50 が SF0 と比較して析出物の形成はより顕著であり、象牙細管や管間象牙質に対する高い被覆・封鎖効果を備えることが示唆されたが、これは、人工唾液との反応生成物に加えて S-PRG フィラー自体の塗布面への沈着も生じたことが反映されたと思われる。また、S-PRG フィラー抽出液に含まれる F, Sr の塗布面への取り込みは、我々がこれまで S-PRG フィラーを添加された修復材料を対象として行った研究と同様に検出されており、S-PRG フィラー抽出液にこれらの材料と同様の効果が期待されると考えられる。一方、対照試片でも表層部に限って、わずかな Ca 高濃度領域が観察されたが、これは人工唾液中の Ca の取り込みによると思われる。本研究の結果は、S-PRG フィラー抽出液と人工唾液との二段階処理が、生活歯形成後の象牙質面の保護や象牙質知覚過敏症の抑制に有効な可能性を示唆するものである。

**結論:** 支台歯形成された象牙質面に S-PRG フィラー抽出液と人工唾液との二段階処理を行うことにより、析出物による象牙細管開口部の封鎖や表層への F, Sr の取り込みが生じた。

### 参考文献

韓 臨麟, 興地隆史: S-PRG フィラー抽出液の人工脱灰象牙質に対する象牙細管封鎖効果, 日歯保存誌 58 (1) 11-25, 2015

## S-PRG フィラーの根管充填用シーラーへの応用と生物学的機能評価

北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室

○眞弓佳代子, 宮治裕史, 宮田さほり, 村上秀輔, 西田絵利香, 薮佳奈子, 田中佐織, 川浪雅光

### Evaluation of biological function of root canal sealer applied with S-PRG filler

Department of Periodontology and Endodontology,  
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

○MAYUMI Kayoko\*, MIYAJI Hirofumi, MIYATA Saori, MURAKAMI Shusuke,  
NISHIDA Erika, SHITOMI Kanako, TANAKA Saori, KAWANAMI Masamitsu

#### 【研究目的】

S-PRG (Surface prereacted glassionomer) フィラーは、多機能性ガラスフィラーの表面にガラスアイオノマー相を形成した3層構造からなり、Fをはじめ、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ のイオンの徐放効果により、再石灰化亢進、抗菌性などの特性を発現することから根管充填用材料への応用が期待されている。しかし、S-PRG フィラーとその複合材料を生体内で使用した場合の生物学的機能ははまだ明らかではない。そこで本研究では、S-PRG フィラーの細胞増殖、抗菌効果をイオン徐放性の無いシリカフィラーと比較検討した。また、S-PRG フィラー含有根管充填用シーラーに対する細胞・組織応答について、シリカフィラー含有シーラーおよび市販のユージノール系シーラーと比較検討した。

#### 【材料と方法】

S-PRG フィラー (松風) およびシリカフィラー (松風) の混濁液を組織培養ディッシュに滴下後、乾燥してコーティング被膜を作製した。まず MC3T3-E1 細胞および NIH3T3 細胞を各フィラー被膜へ播種し、1, 3, 5 日培養後の細胞増殖量を評価した。次に、同様に作製した各フィラーのコーティング被膜上に *S. mutans* を播種し、24 時間培養後に濁度を測定して抗菌性の評価を行った。

次に、S-PRG フィラー含有シーラー (松風)、シリカフィラー含有シーラー (松風)、およびキャナルス (昭和薬品化工) を指定の粉液比にて練和してチューブに流し込み、直径 5 ミリ、高さ 2 ミリのディスクを作製した。各々のシーラーの表面性状、細胞親和性および抗菌性について SEM 観察にて評価した。さらに、3 種類のシーラーディスクをラットの背部皮下に埋入し、10 日後の生体親和性について組織学的観察を行い、炎症の程度を比較検討した。なお動物実験は北海道大学動物実験委員会の審査承認を受けて行った (承認番号 12-02)。

#### 【結果と考察】

S-PRG フィラーコーティング被膜での培養試験の結果、S-PRG フィラーの配合量依存的に細胞増殖が促進された。一方、シリカフィラー被膜では細胞増殖性に変化を認めなかった。また、S-PRG フィラーはシリカフィラーに比較して菌の増殖抑制効果を認めた。S-PRG フィラーのガラスアイオノマー層と徐放イオンが生物学的特性を持つ可能性が示唆された。

次に S-PRG フィラー含有シーラーおよびシリカフィラー含有シーラーへ細胞を播種培養した結果、ディスク表面への細胞の付着伸展を認めたが、キャナルス表面では細胞伸展は認めなかった。*S. mutans* の付着増殖はいずれのシーラーでも認めなかった。ラットの背部皮下埋入後の組織学的観察の結果、S-PRG フィラー含有シーラーでは他シーラーに比較してペルオキシターゼ陽性細胞、CD68 陽性マクロファージの浸潤が少なかった。細胞浸潤のスコアでは、S-PRG フィラー含有シーラーが最も少なく、キャナルスが最も高かった。シーラーに配合された S-PRG フィラーは生体親和性を向上させる効果があると考えられた。

#### 【結論】

S-PRG フィラーはシリカフィラーに比較して良好な細胞親和性および抗菌性を示した。また、S-PRG フィラー含有シーラーはシリカフィラー含有シーラー、ユージノール系シーラーと比較して良好な生体親和性を示した。

## Er:YAG レーザーを利用した根管洗浄の根管側枝清掃効果

○八尾香奈子<sup>1</sup>, 本郷智之<sup>1</sup>, 佐竹和久<sup>1</sup>, 渡辺 聡<sup>1</sup>, 海老原新<sup>1</sup>, 小林千尋<sup>2</sup>, 興地隆史<sup>1</sup>

1. 東京医科歯科大学 大学院医学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

2. 東京医科歯科大学歯学部附属病院 歯科総合診療部

Cleaning Efficacy of Er:YAG Laser-activated Root Canal Irrigation for Lateral Canals

○YAO Kanako<sup>1</sup>, HONGOU Tomoyuki<sup>1</sup>, SATAKE Kazuhisa<sup>1</sup>, WATANABE Satoshi<sup>1</sup>, EBIHARA Arata<sup>1</sup>, KOBAYASHI Chihiro<sup>2</sup> and OKIJI Takashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

<sup>2</sup>Oral Diagnosis and General Dentistry, Dental Hospital, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

### 【目的】

根管洗浄は歯内療法の重要なステップの一つであり、通常はシリンジを使用する根管洗浄 (conventional irrigation, 以下 CI) や超音波洗浄 (passive ultrasonic irrigation, 以下 PUI) が用いられている。一方、演者らは Er:YAG レーザーを用いた根管洗浄 (laser-activated irrigation, 以下 LAI) の有効性や安全性を検討しており、LAI で生じる根尖孔外への圧力や洗浄液の溢出量がチップ設定位置や出力に応じて有意に変化すること、あるいは LAI での根尖孔外への洗浄液溢出量は CI よりも少ないことなどをすでに報告している<sup>1)</sup>。本研究では、LAI が根管側枝に高い清掃効果を及ぼす可能性に着目し、その作用を水酸化カルシウム材除去効果を指標として評価した。

### 【材料および方法】

模型底部から 6 mm, 12 mm の位置に 2 つの側枝を有する J タイプ規格根管模型 (Thermafil Training Bloc, Dentsply Maillefer; n = 30) を模擬根管として用いた。この側枝部に水酸化カルシウム材 (カルシベック II, 日本歯科薬品) を 1.0% メチレンブルーで染色したものを満たし、以下の 3 種類の洗浄を行った。

- 1) LAI 群: Er:YAG レーザー装置 (Erwin AdvErL, モリタ製作所) および付属チップ (R200T, 同) を使用し、模擬根管内に満たした蒸留水に対して 30 mJ、10 pps の出力条件で作用させた。
- 2) PUI 群: 超音波装置 (Piezon Master 400, EMS, 最小設定値) を用い、超音波チップ (#15 U-file, 松風) を使用し、模擬根管内に満たした蒸留水に作用させた。
- 3) CI 群: 27G 洗浄針およびシリンジを用いて、1ml の蒸留水で 20 秒間洗浄を行った。

各群とも根管模型の底部から 6 mm, 12 mm 手前にチップまたは洗浄針の先端を設置し、各 20 秒×3 回、計 60 秒間作用させたのち、20 秒ごとに 27G 洗浄針およびシリンジを用いて蒸留水で洗浄した。

実験結果は手術用顕微鏡 (OPMI Pico with MORA interface, Carl Zeiss) および医用動画記録システム (DATA Gen PRO for DENTAL, セブンスディメンジョンデザイン) にて記録し、画像解析ソフトウェア (Photoshop CS5, Adobe) を用いて、側枝における実験前後の水酸化カルシウム材の面積を計測し、側枝における水酸化カルシウム材除去率を評価した。統計学的解析には一元配置分散分析および Tukey-Kramer 検定を用い、有意水準を 5% とした。

### 【結果】

チップまたは洗浄針の先端を根管模型の底部から 6 mm の位置として洗浄した場合、水酸化カルシウム材除去率は LAI 群、PUI 群が CI 群に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。一方、チップまたは洗浄針の先端を 12mm の位置に設置して洗浄した場合は、LAI 群の水酸化カルシウム材除去率は PUI 群、CI 群に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

### 【考察および結論】

今回の実験条件では、LAI は、チップ先端から離れた位置に存在する側枝に対し、PUI および CI よりも優れた水酸化カルシウム材除去効果を示すことが判明した。LAI、PUI とも根管内にキャビテーション、高速の水流、衝撃波を発生させるとされており、今回の結果は、LAI ではこれらの作用が離れた位置まで及びやすいことを示唆するものである。従って、洗浄液溢出の可能性が低いと考えられる低出力根管上部照射においても、LAI が側枝に対する洗浄効果を示すことが推察される。

### 【文献】

- 1) 佐竹和久、渡辺聡、井手彩集他、Er:YAG レーザーを用いた根管洗浄時に生じる根尖孔外の圧力。日本レーザー歯学会誌 2014. 08;25(2):70-74.

### 次亜塩素酸ナトリウムおよび EDTA で処理した象牙質ディスクにおける歯乳頭細胞の接着と分化

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野,

\*東北大学 大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野

○橋本健太郎、川島伸之、野田園子、奈良圭介、Alamuddin Bakhit、齋藤正寛\*、興地隆史

#### Attachment and Differentiation of Dental Papillae Cells on Sodium Hypochlorite and/or EDTA-treated Dentin Disks

Tokyo Medical and Dental University (TMDU) Graduate School of Medical and Dental Sciences Div. of Oral Health Sciences Dept. of Pulp Biology and Endodontics, \*Tohoku University Graduate School of Dentistry Dept. of Restorative Dentistry Div. of Operative Dentistry

○Kentarō Hashimoto, Nobuyuki Kawashima, Sonoko Noda, Keisuke Nara, Alamuddin Bakhit, Masahiro Saito\*, Takashi Okiji

#### <緒言>

根尖性歯周炎を発症した根未完成歯の根部歯髄を再生させることを目的とした *revascularization* と呼ばれる手法が注目されている。本法においても通常の根管処置と同様に細菌の排除が重要であり、次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) 溶液による洗浄を十分に行う必要がある。しかし、NaOCl は象牙質表面の変性させ、細胞の象牙質への接着や分化を阻害すると報告されているため、6%溶液ではなく 1.5%溶液の大量使用が推奨されている。一方、NaOCl 処理後、EDTA 処理により細胞の接着が回復すると報告されているが、NaOCl および EDTA 処理後の細胞接着や遺伝子発現の検討は十分にはなされていない。今回、濃度の異なる NaOCl および EDTA で処理したウシ象牙質ディスクに対するマウス歯乳頭細胞の接着および分化について検討したので報告する。

#### <材料および方法>

ウシ抜去切歯の歯冠を除去後、K ファイル#40 にて歯髄を除去、全周ファイリングを行った。次いで 1%NaOCl 溶液 (次亜塩 6%「ヨシダ」、ヨシダ製薬) で洗浄後、Isomet®にて歯軸と垂直に切断して厚さ 1 mm の象牙質ディスクを作成し、70%エタノールに 5 分間浸漬して滅菌後、培養液 ( $\alpha$  MEM+10%FBS) に 24 時間浸漬したのち実験に使用した。これらの象牙質ディスクを NaOCl 処理群 (1.5%あるいは 6%NaOCl 溶液に 5 分間浸漬) と非処理群 (リン酸緩衝食塩液中で保管) に分け、さらにスメアクリン (3% EDTA 溶液、日本歯科薬品) あるいは 17% EDTA (同仁化学研究所) 溶液に 10 分間浸漬することにより EDTA 処理を行った。

被験細胞としてマウス歯乳頭細胞(Mouse Dental Papillae cells: MDPs)を使用し、AcGFP (*Aequorea coerulescens* green fluorescent protein) 発現ベクター (自作) をトランスフェクション (Neon, Life Technologies) して蛍光ラベル (transient expression) を行った。象牙質ディスクを 48 ウェルプレートに入れ、各ウェルに MDP 細胞を  $4 \times 10^4$  個播種し、24 時間後に蛍光顕微鏡下で細胞接着を観察した。また、培養 48 時間後に MDP 細胞から抽出した RNA を cDNA に逆転写した後、骨芽・象牙質細胞マーカー発現をリアルタイム PCR (CFX96, BioRad) にて解析した。

#### <結果および考察>

NaOCl 非処理群: 蛍光ラベルした細胞の接着は、EDTA 処理により大きな影響を受けなかった。骨芽・象牙質細胞マーカー発現において、EDTA 溶液処理により *Alp*、*Bmp2*、*Dmp1*、*Dspp* の発現の増加 ( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer) が認められた。EDTA の濃度は、遺伝子発現量に大きな影響を与えなかった。

NaOCl 処理群: 6%NaOCl で処理した象牙質ディスク上に MDP 細胞は全く認められなかった。1.5%NaOCl で処理した群では少数ながら MDP 細胞を認めたが、線維芽細胞様の形態ではなく円形をしており、ディスクに伸展できていないと推察された。EDTA 処理により、6%、1.5%両群で MDP 細胞が観察され、特に 1.5%NaOCl 溶液+17% EDTA 溶液処理群では線維芽細胞様の形態を示していた。遺伝子発現の解析において、6%NaOCl 処理群では、EDTA 処理後においても象牙質ディスクに播種した MDP 細胞から RNA 抽出はできなかった。1.5%NaOCl 処理群においては、EDTA 非処理の象牙質ディスクに播種した MDP 細胞からの RNA 抽出ができなかったが、EDTA 処理により RNA 抽出は可能となった。特に 1.5%NaOCl 処理後スメアクリンで処理した象牙質ディスク上で培養した MDP 細胞において、通常のディッシュで培養した MDP 細胞と比較して、*Dspp* の発現の増加が認められた ( $p < 0.05$ , Tukey-Kramer)。

#### <結論>

NaOCl 処理により MDP 細胞の接着および骨芽・象牙質細胞マーカー発現は抑制されるが、1.5% NaOCl 処理後に EDTA 処理を行うことにより接着能の回復および骨芽・象牙質細胞マーカー発現の亢進が認められた。